

Insekten-Neuropeptide: Struktur-Wirkungs-Untersuchungen, Konformationsanalysen und Peptidomimetika



DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades Dr. rer. nat.

Angefertigt im Fachbereich C, Mathematik und Naturwissenschaften
der Bergischen Universität Wuppertal

Von Tino Zdobinsky

geb. am 27.04.1983 in Altenburg

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20110930-124836-2

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:468-20110930-124836-2>]

*„Die Tragödie der Wissenschaft - das Erschlagen
einer schönen Hypothese durch eine häßliche Tatsache.“*

Thomas Henry Huxley (1825-95), brit. Zoologe

Eingereicht am: 25.8.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 26.9.2011

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Scherkenbeck

2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Altenbach

3. Gutachter: Prof. Dr. O. Zerbe

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2007 bis August 2011 am Lehrstuhl für Organische Chemie des Fachbereichs C – Mathematik und Naturwissenschaften, Fachgruppe Chemie der Bergischen Universität Wuppertal angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck für die Überlassung des interessanten Themas, den gewährten wissenschaftlichen Freiraum und den produktiven, wissenschaftlichen Diskussionen.

Meinen Laborkollegen danke ich für die freundliche Aufnahme, die netten Unterhaltungen und die wissenschaftlichen Diskussionen. Besonders möchte ich mich bei Frau Nadine Meyer, Herrn Sebastian Lüttenberg und Herrn Christian Beyer für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Herrn Frank Sondermann und Frau Karolin Sembritzki sowie dem Forschungspraktikant Daniel Gallenkamp und der Praktikantin Cansu Alagöz danke ich für die synthetische Unterstützung.

An dieser Stelle danke ich allen, die durch die Aufnahme von Analysen und der Aufnahme von Spektren zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Für die Aufnahmen zahlreicher Kernresonanz-, HPLC-MS-, HPLC-UV- und GC-Spektren danke ich Herrn Andreas Siebert, Herrn Jürgen Dönecke, Frau Ilka Polanz und Frau Melanie Dausend. Herrn Horst Antonicek von Bayer CropScience danke ich für die Messung der biologischen Daten. Herrn Prof. Dr. Oliver Zerbe danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis während meines Aufenthalts in Zürich sowie der ausgiebigen Unterstützung in der Konformationsanalyse membrangebundener Peptide.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine gesamte Familie, die mich die letzten Jahre im besonderen Maße moralisch unterstützt hat. Für den nötigen Ausgleich außerhalb der Universität danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meinen Sportkollegen.

Abstract

Insect neuropeptides have been isolated from a wide variety of insects. These small peptide hormones are involved in numerous essential regulation processes, such as growth, molting, metamorphosis, reproduction and diuresis. The neuropeptides and in particular their receptors represent promising targets for a novel generation of selective and environmentally beneficial insecticides. The myokininins form a large group of insect neuropeptides expressing myotropic and potent diuretic activities. Their short sequences and interference with vital physiological insect specific processes render the myokininins prime candidates for the design of metabolically stable peptidomimetics.

The first part of the thesis deals with the development of a valid binding model for the neuropeptide helicokinin I to its receptor of *Helicoverpa zea*, a serious agricultural pest. This includes a comprehensive receptor assay guided structure-activity study of helicokinin insect neuropeptides and first peptidomimetic analogues. In accordance to the “membrane compartment theory” the membrane bound conformation of helicokinin I and selected linear analogues are determined by NMR spectroscopy. Conclusions of the “biological active” conformation are drawn by comparing the membrane bound structures with the biological results. Further on, preferred conformations of the relevant neuropeptides tachykinin and Myosuppressin are elucidated.

The second part of this work describes the “conformational design”, using small cyclic helicokinin analogues. Five cyclopeptides of different size have been synthesized and studied in the receptor assay and by NMR spectroscopy in a membrane mimicking environment.

The last part of this dissertation focuses on the synthesis of tailor-made mimics of the C-terminal type-I β -turn in helicokinin I. Three new scaffolds have been carefully selected, based on molecular modeling studies and synthesized. The scaffolds have been integrated in the helicokinin sequence, and their ability to mimic the β -turn structure was studied by conformational analysis.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1. Insektenneuropeptide	1
2. Potential von Neuropeptiden als selektive und umweltfreundliche Insektizide	3
II Allgemeiner Teil	4
1. Helicokinin I, Myosuppressin und Tachykinin als Leitstrukturen für die Entwicklung umweltfreundlicher Insektizide	4
1.1 Myosuppressin	4
1.2 Tachykinin.....	5
1.3 Helicokinin I-III	6
2. Rezeptorbindung von Neuropeptiden.....	7
2.1 Neuropeptidrezeptoren	7
2.2 Ermittlung der „biologisch aktiven“ Struktur	9
2.3 Rezeptorbindung der Kinine – Stand der Forschung	10
3. Sekundärstrukturelemente von Peptiden.....	14
4. Stabilisierung von Sekundärstrukturen – Peptidomimetika	16
5. Biologische Testsysteme	17
III Zielsetzung	19
IV Ergebnisse und Diskussion	20
1. Struktur-Wirkungsuntersuchungen linearer Helicokinin I-Analoga	20
1.1 Synthese linearer Neuropeptide und linearer Helicokinin I-Analoga	20
1.2 Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen linearer Helicokinin I-Analoga.....	22
2. NMR-Konformationsuntersuchungen der Insekten-Neuropeptide	27
2.1 Grundlagen der Konformationsanalyse von Peptiden mittels NMR.....	27
2.2 Durchführung der NMR-Messungen an artifiziellen Membranen	28
2.3 Messung und Auswertung der NOESY-Spektren.....	29
2.4 Konformationsberechnungen mit dem Programm CYANA.....	30

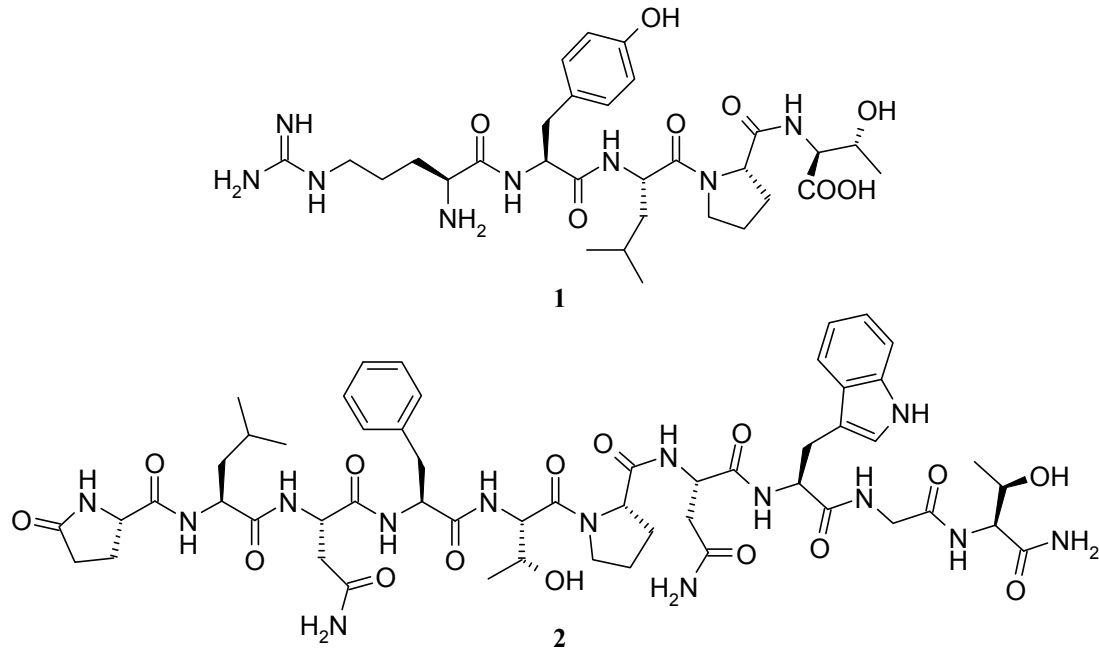
2.5 Spin-Label Experimente.....	31
2.6 NMR-Untersuchungen der Insekten-Neuropeptiden	32
2.6.1 Myosuppressin	32
2.6.2 Tachykinin.....	34
2.6.3 Helicokinin I.....	35
2.7 Konformationsuntersuchungen ausgewählter linearer Helicokinin I-Derivate.....	39
3. „Conformational Design“ – Cyclopeptide als Vorlage zum Design von Peptidmimetika	41
3.1 Konzept des „Conformational Designs“	41
3.2 Synthese cyclischer Helicokinin I-Analoga	43
3.3 Biologische Untersuchungen cyclischer Helicokinin I-Analoga	45
3.4 Konformationsanalysen cyclischer Helicokinin I-Analoga	46
4. Konformativ eingeschränkte β -Turn Mimetika.....	48
4.1 Wahl geeigneter β -Turn Mimetika.....	48
4.2 Synthese der Mimetika.....	50
4.2.1 Synthese des Octahydro-pyrazino[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3,6-dions.....	50
4.2.1.1 Bekannte Synthesen analoger Verbindungen.....	50
4.2.1.2 Retrosynthetische Überlegungen zum bicyclischen Turnmimetikum	51
4.2.1.3 Synthese von <i>N</i> -Nosyl-Aminosäuren als zentrale-Bausteine.....	52
4.2.1.4 Syntheseversuch mit 2,3-Dibrompropanderivaten als C ₃ -Baustein	53
4.2.1.5 Synthese mit Glycidol als enantiomerenreiner C ₃ -Baustein	55
4.2.1.6 Rezeptor-Screening und Konformationsuntersuchung des Helicokinin-Analogen	69
4.2.2 Synthese des 1,4,7-Triazacycloundec-9-en-2,5-dions.....	72
4.2.2.1 Retrosynthetische Überlegungen zum Turnmimetikum	72
4.2.2.2 Synthese der Allyl-Aminosäurebausteine	72
4.2.2.3 Verknüpfung der Allyl-Aminosäurebausteine zum Tripeptid	73
4.2.2.4 Ringschlussmetathese zum 11-gliedrigen Makrocyclus	76

4.2.2.5 Einbau des Turnmimetikums in das Helicokinin I.....	78
4.2.3 Synthese des C ₂ -verbrückten Turnmimetikums.....	81
4.2.3.1 Bekannte analoge Verbindungen	81
4.2.3.2 Retrosynthetische Überlegungen zum Turnmimetikum	82
4.2.3.3 Synthese mit Bromacetaldehyddiethylacetal als C ₂ -Baustein.....	85
4.2.3.4 Syntheseroute mit 2-Bromethanol als C ₂ -Baustein.....	87
4.2.3.5 Darstellung des Alaninanalogs.....	95
4.2.3.6 Planung einer alternativen Syntheseroute	103
4.3 Konformationsuntersuchungen eines weiteren Turnmimetikums.....	106
V Zusammenfassung und Ausblick	108
VI Experimenteller Teil.....	111
1. Allgemeine Angaben	111
2. Vorschriften zur Festphasensynthese der Peptide	113
3. Verbindungen aus Kapitel 4.2.1	118
4. Verbindungen aus Kapitel 4.2.2	142
5. Verbindungen aus Kapitel 4.2.3	149
6. Chemische Verschiebungen membrangebundener Peptide.....	175
VII Literaturverzeichnis	181

I Einleitung

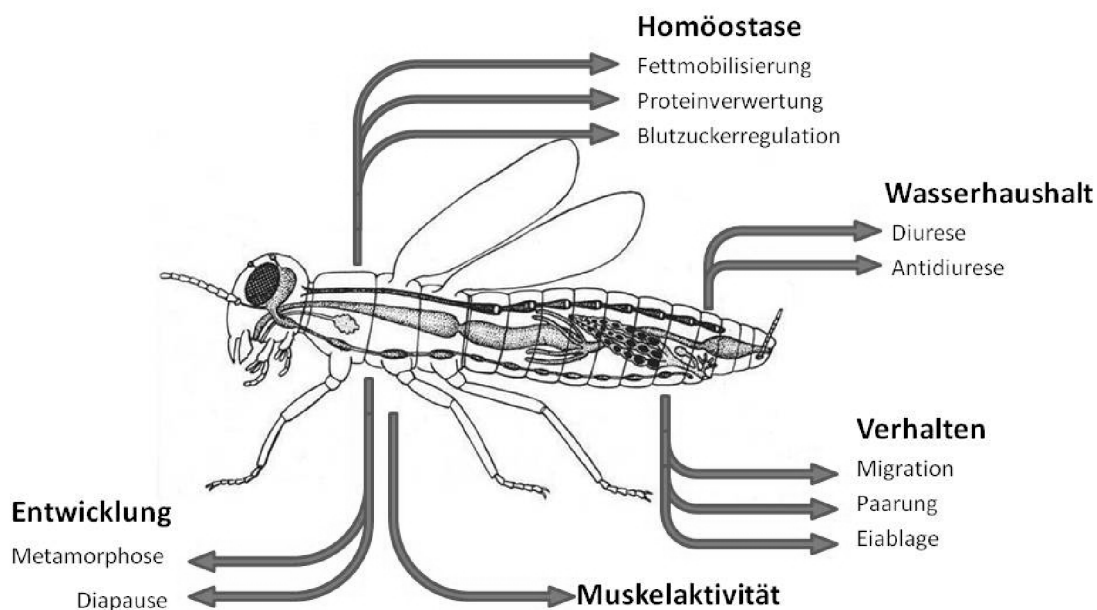
1. Insektenneuropeptide

Aufgrund der steigenden Weltbevölkerung ist besonders der Pflanzenschutz in den Fokus des öffentlichen Interesses gerückt, um auch zukünftig die Weltbevölkerung mit ausreichend Nahrungsmitteln versorgen zu können. Selbst heutzutage wird noch ein beachtlicher Teil der Ernte durch Schädlinge zerstört. Einen nicht unerheblichen Anteil hieran haben Insekten. Sie sind aber auch Überträger schwerwiegender Krankheiten wie der Malaria oder der Schlafkrankheit. Daher ist die Entwicklung von Insektiziden, die einen insekten-spezifischen Wirkmechanismus besitzen und un-toxisch für Warmblüter und Nutzinsekten sind, von besonderem Interesse. Dies führte zu einer verstärkten Forschung auf dem Gebiet der Insekten-Neuropeptide, da diese für die Insekten fundamentale Bedeutung besitzen. Erstmals postuliert wurde die Steuerung der Metamorphose durch im Gehirn produzierte Substanzen im Jahre 1922 von dem polnischen Wissenschaftler Stefan Kopeć.^[1] Heutzutage sind zahlreiche biochemische Prozesse in Insekten bekannt, die durch kleine, bioaktive Peptide gesteuert werden. Neuropeptide werden in neurosekretorischen Zellen (speziellen Neuronen) produziert und von dort über die Hämolymphe zu den Zielorganen transportiert.^[2] Die Isolation der ersten Insekten-Neuropeptide gelang jedoch erst Mitte der 70er Jahre: das myotrope Proctolin (**1**) aus der Schabe *Periplaneta americana* im Jahre 1975^[3] und ein Jahr später AKH, das adipokinetische Hormon (**2**) der Heuschrecken.^[4] Durch Fortschritte in der Genomforschung, der Protein-Massenspektrometrie und der Hochfeld-NMR-Spektroskopie wurden seit Ende der 80er-Jahre enorme Fortschritte im Bereich der Neuropeptide erzielt, so dass heutzutage die Primärsequenzen etlicher hundert Neuropeptide bekannt sind.^[2,5-9] Allein im Genom von *Drosophila melanogaster* gibt es Hinweise auf mehr als 40 Neuropeptid-Rezeptoren, sowie mindestens 30 Gene, die Neuropeptidvorstufen codieren.^[10,11]

Abb. 1: Struktur der ersten isolierten Insekten-Neuropeptide Proctolin (1) und des adipokinetischen Hormons (2)

Insektenneuropeptide sind allgegenwärtig im Nervensystem von Insekten und stellen sowohl strukturell als auch funktionell Signalsubstanzen mit der höchsten Diversität dar.^[12] Die Neurohormon-gesteuerten Prozesse lassen sich in vier Hauptkategorien untergliedern:^[13]

1. Wachstum und Entwicklung
2. Verhalten und Reproduktion
3. Metabolismus und Homeostase
4. Muskelaktivität

Abb. 2: Durch Neuropeptide gesteuerte biochemische Prozesse in Insekten

2. Potential von Neuropeptiden als selektive und umweltfreundliche Insektizide

Insekten-Neuropeptide, respektive ihre Rezeptoren, stellen vielversprechende Targets für die Entwicklung einer neuen Generation umweltverträglicher und selektiver Insektizide dar. Die Wirkungsweise konventioneller Insektizide beruht zum überwiegenden Teil auf deren Neurotoxizität, wovon nicht nur Umweltschädlinge sondern auch Nutzinsekten betroffen sind.^[14-16] Ziel der heutigen Insektizidforschung ist die Adressierung physiologisch essenzieller, artspezifischer biochemischer Prozesse mit dem Ziel, eine insektizide Wirkung ausschließlich gegenüber der Zielspezies hervorzurufen. Zusätzliche interessante Ansatzpunkte für die Entwicklung von Insektiziden sind die Mechanismen, die für die Synthese, den Transport, die Sekretion sowie Bindung und Desaktivierung der Neuropeptide verantwortlich sind. Die Verwendung von Peptiden als Insektizide wird jedoch durch eine ganze Anzahl von Faktoren eingeschränkt.

- Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts und ihrer hohen Polarität werden Peptide meist nur schlecht resorbiert.
- Peptide besitzen in der Umwelt nur eine begrenzte Stabilität.
- Peptide sind sowohl in organischen Lösungsmitteln als auch in Wasser nur begrenzt löslich.
- Peptide unterliegen einem schnellen Abbau durch Peptidasen im Verdauungstrakt der Insekten.

Infolgedessen wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, effiziente Applikationsverfahren zu entwickeln. Besonders die Verwendung von genetisch modifizierten Baculoviren als Vektoren für Neuropeptid-exprimierende Gene und Proteine wurde intensiv untersucht.^[17,18] Vom Standpunkt eines Chemikers erscheint die Beeinflussung der Rezeptorbindung oder der Signaltransduktion durch kleine organische Moleküle als vielversprechendster Ansatz zur Entwicklung Neuropeptid-basierender Insektizide.

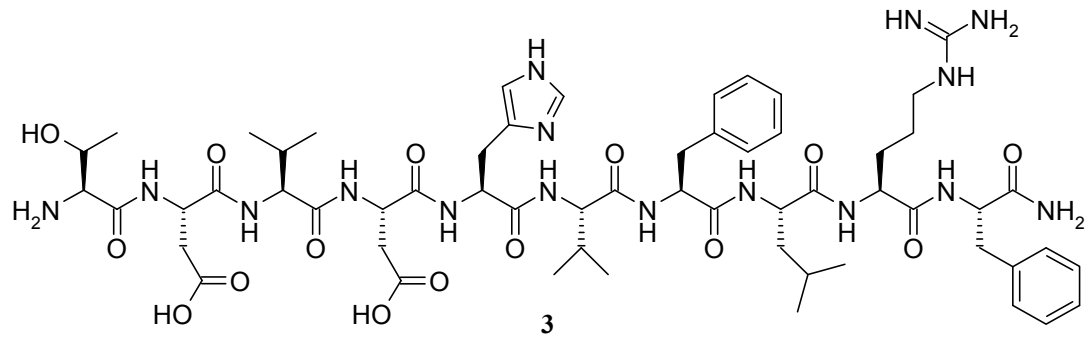
II Allgemeiner Teil

1. Helicokinin I, Myosuppressin und Tachykinin als Leitstrukturen für die Entwicklung umweltfreundlicher Insektizide

Eine Strategie für die Entwicklung von umweltfreundlichen Insektiziden ist die Verwendung von biologisch aktiven Neuropeptiden als Leitstruktur. Diese werden durch chemische Modifikationen in wirksame, metabolisch stabile Verbindungen überführt. Diese Vorgehensweise hat sich bereits im Pharmabereich bewährt. In diesem Abschnitt sollen die Neuropeptide Myosuppressin, Tachykinin und die Helicokinine vorgestellt werden, da sie lebenswichtige physiologische Prozesse in ökonomisch relevanten Schadinsekten kontrollieren.

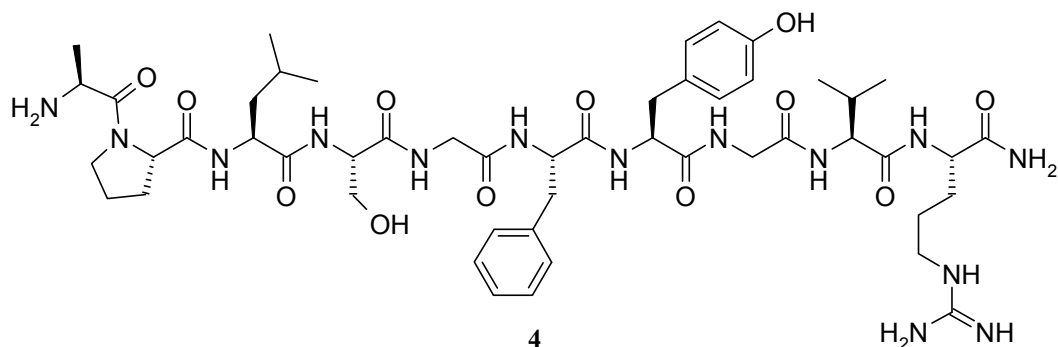
1.1 Myosuppressin

Myosuppressine wurden aus einer Vielzahl von Insekten wie der Schabe *Leucophaea maderae*, den Heuschrecken *Schistocerca gregaria* und *Locusta migratoria* sowie den Fliegen *Neobellieria bullata* und *D. melanogaster* isoliert.^[19] Myosuppressine zeigen eine potente Inhibition der Herz- und Darmmuskelkontraktion.^[20,21] Myosuppressine teilen das C-terminale Heptapeptid Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂, das zugleich das kleinste Fragment mit voller muskelinhibierender Wirkung darstellt.^[22] Das für unsere Arbeiten gewählte Myosuppressin **3** (Ang-MS) wurde aus der Stechmücke *Anopheles gambiae* isoliert und zeigt biologische Aktivitäten vergleichbar mit denen konventioneller neurotoxischer Insektizide.^[23] Während herkömmliche Insektizide aufgrund ihrer neurotoxischen Wirkung eine Gefahr für Mensch und Umwelt darstellen, bergen von Neuropeptiden abgeleitete Substrate erhebliches Potential als selektive und umweltfreundliche Insektizide. Die *Anopheles*-Mücke gilt als Hauptüberträger der Tropenkrankheit Malaria, an der jährlich zwischen 1.5 und 2.7 Millionen Menschen sterben.^[24] Daher stellt eine effiziente Bekämpfung der *Anopheles*-Mücke in Epidemie-Gebieten einen vielversprechenden Ansatz zur Eindämmung der Malaria dar.

Abb. 3: Sequenz des Myosuppressin (Ang-MS): Thr-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (3)

1.2 Tachykinin

Im Gegensatz zu den meisten Neuropeptid-Klassen konnten Tachykinine sowohl aus Insekten als auch aus Wirbeltieren isoliert werden. Diese multifunktionellen Neurohormone kommen im Hirn und im Darm vor und sind an der Verarbeitung sensorischer Informationen, der Kontrolle motorischer Aktivitäten und in der sensorischen Steuerung der Darmmuskelaktivität beteiligt. Insekten-Tachykinine wurden aus diversen Insekten wie der Heuschrecke *L. migratoria*, den Fliegen *Calliphora vomitoria* und *Stomoxys calcitrans*, der Mücke *Culex salinarius* sowie der Schabe *L. maderae* isoliert. Die Mehrzahl der Insekten-Tachykinine teilen die gemeinsame C-terminale Sequenz Gly-Phe-X¹-Gly-X²-Arg-NH₂.^[25-28] Aufgrund des hohen wirtschaftlichen Schadens der Wanderheuschrecke und der vielfältigen Wirkungsweise der Tachykinine wurde das Locustatachykinin Lom-TK II (4) als Target für unsere Konformationsuntersuchungen gewählt.

Abb. 4: Sequenz des Tachykinin (Lom-TK II) Ala-Pro-Leu-Ser-Gly-Phe-Tyr-Gly-Val-Arg-NH₂ (4)

1.3 Helicokinin I-III

Myokinine bilden eine große Gruppe von Insekten-Neuropeptiden, die aus zahlreichen Insekten wie Dictyoptera, Orthoptera und Lepidoptera isoliert wurden. Alle Kinine haben das C-terminale Pentapeptid Phe-X¹-X²-Trp-Gly-NH₂ mit Phe, Ser, His, Asn, Tyr als X¹ und Ser, Pro oder Ala als X² gemeinsam. Diese aus 6-15 Aminosäuren bestehenden Peptide besitzen myotrope und potente diuretische Aktivitäten.^[29-31] Die Myokinine stimulieren die Sekretion von Flüssigkeit über Aktivierung der malpighischen Gefäße. Diese Organe regeln den Salz- und Wasserhaushalt in Insekten. Die Helicokinine aktivieren die Wasserausscheidung in Konzentrationen von 10⁻¹¹-10⁻¹² M. Damit wirken sie synergistisch mit den größeren „Corticotropin releasing hormons“ (CRH).^[32-34] Die Helicokinine I-III (5, 6, 7) wurden erstmals 1995 von Blackburn aus der Motte *Helicoverpa zea* isoliert.^[35]

Abb. 5: Das Schadinsekt *Heliothis virescens* im Raupen-Stadium (links) und als adulte Motte (rechts)^a

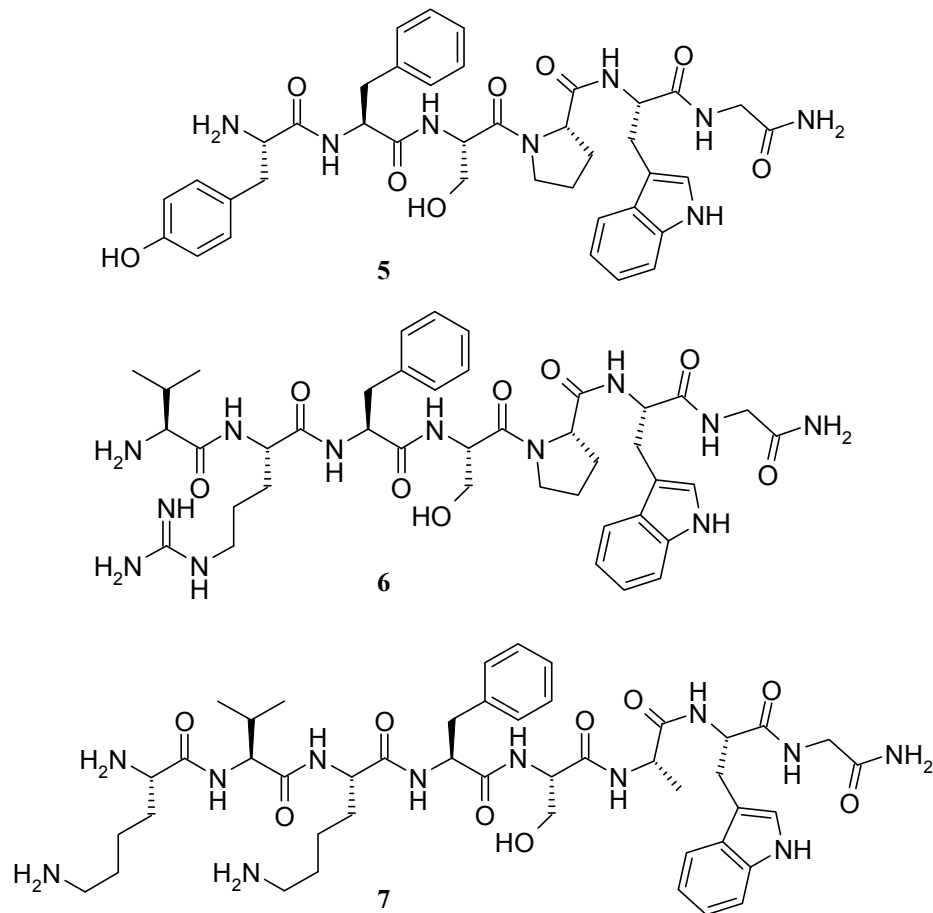


Durch *in vivo* Versuche mit Larven des ökonomisch wichtigen Landwirtschaftsschädling *Heliothis virescens* wurden eine verringerte Gewichtszunahme sowie eine erhöhte Mortalitätsrate festgestellt. Insofern ist dies einer der wenigen Fälle in dem gezeigt wurde, dass durch die Verabreichung einer Neuropeptid-Überdosis ein letaler Effekt hervorgerufen wird.^[36-38]

Eine signifikante Verstärkung der Aktivität des Helicokinin I (5) konnte durch zusätzliche Verabreichung von ACE-Hemmern wie Captopril und Enalapril erreicht werden, die den proteolytischen Abbau der Kinine unterdrücken.^[36] Aufgrund ihrer kurzen Sequenz und der Steuerung lebenswichtiger physiologischer Prozesse sind Helicokinine ideale Leitstrukturen für die Entwicklung metabolisch stabiler Peptidomimetika.

^a Abbildung von: <http://www.gardengatenotes.com/> und www.hmana.org/mothpix/fm0601a3.jpg

Abb. 6: Sequenz des Helicokinin I (5): Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH₂, Helicokinin II (6): Val-Arg-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH₂ und Helicokinin III (7): Lys-Val-Lys-Phe-Ser-Ala-Trp-Gly-NH₂

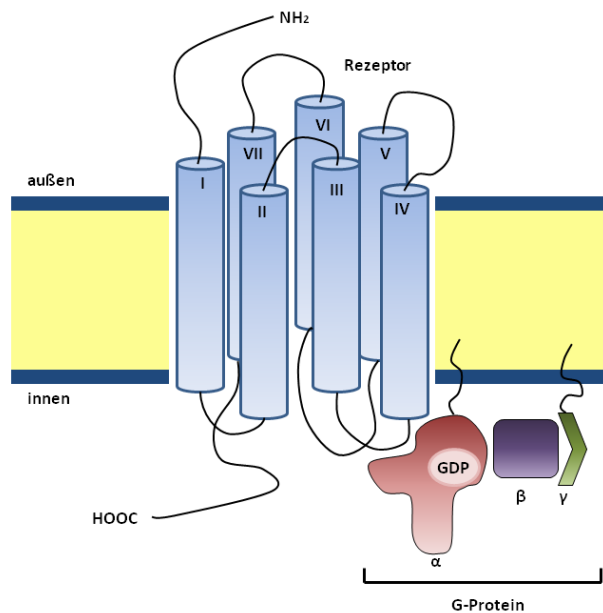


2. Rezeptorbindung von Neuropeptiden

2.1 Neuropeptidrezeptoren

Insekten-Neuropeptide binden, wie seit einiger Zeit bekannt ist, an membrangebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR's). Seit der Klonierung des Rinderopsins im Jahre 1983^[39] wurden über 5000 weitere GPCR's beschrieben.^[40] Sie bilden die größte Gruppe an Rezeptoren und sind zusammen mit Ionenkanälen und Rezeptor-Tyrosinkinasen für die Weiterleitung extrazellulärer Signale in das Zellinnere verantwortlich. GPCR's konnten nicht nur in Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen werden, sondern auch in Protozoen, Pilzen und Pflanzen.^[41-46] GPCR's bestehen aus sieben α -Helices, die in die Zellmembran eingebettet sind. Die Helices sind untereinander durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen verbunden. Der N-Terminus des Rezeptors ragt in den extrazellulären Raum, der C-Terminus befindet sich im Zytoplasma. Die Klassifizierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren erfolgt anhand ihrer Sequenzhomologie und ihrer funktionellen Eigenschaften. Die mit Abstand größte Gruppe mit ~90 % aller GPCR's stellen die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (Familie 1) dar.^[47] Weitere wichtige Rezeptorklassen sind die Glutamat-, Adhäsions-,

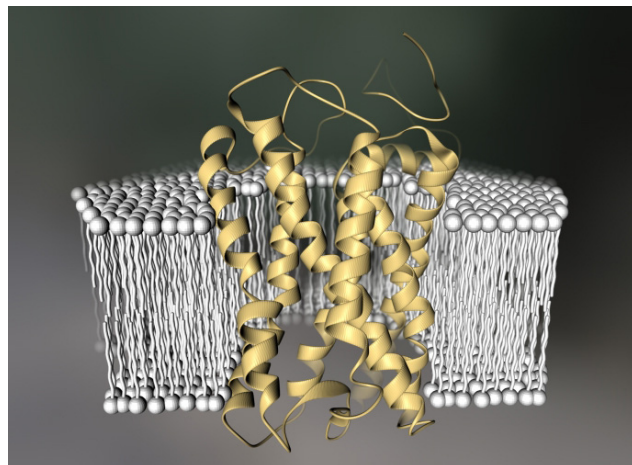
Abb. 7: schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors



innenseite der Membran interagieren die allosteren 7TM-Rezeptoren mit heterotrimeren G-Proteinen und induzieren dadurch die Signalverstärkung über vielfältige Second-Messenger-Kaskaden. Für das gezielte Design von Agonisten bzw. Antagonisten sind mannigfaltige Informationen über die Struktur und Funktion der Rezeptoren notwendig. Aufgrund der inhärenten Probleme während der Expression, Säuberung und Kristallisation dieser Membranproteine konnte bisher nur eine überschaubare Anzahl an dreidimensionalen GPCR-Strukturen durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden, darunter Rhodopsin,^[47,49,50] der humane β_2 -Adrenozeptor,^[51-53] der β_1 -Adrenozeptor,^[54] der Adenosin A_{2A} -Rezeptor^[55] und das Rhodopsin von Kalmaren.^[56] Im Jahre 2010 wurde zum ersten Mal die Struktur eines in Mizellen eingebetteten GPCR's vollständig mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie aufgeklärt.^[57] Durch Weiterentwicklung der Analyseverfahren und Automatisierung der Analysemethoden ist zukünftig die Aufklärung einer steigenden Anzahl an GPCR-Strukturen zu erwarten.

Frizzled/Taste- und die Sekretierungsgruppe.^[48] Aufgrund ihrer Bindungsdomäne können die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren weiter untergliedert werden. Familie 1a enthält Rezeptoren für kleine Liganden, deren Bindungsdomäne innerhalb der sieben transmembranen Helices liegt. Rezeptoren der Familie 1b binden ihre Peptidliganden innerhalb der N-terminalen Domäne und den extrazellulären Loopregionen. Die Klasse 1c umfasst Glycoproteinrezeptoren, deren Bindungsdomäne die extrazelluläre N-terminale Peptidkette ist. Auf der

Abb. 8: Struktur eines GPCR's in einer Membrenumgebung, die Bindungsstelle für die Liganden liegt in der unmittelbaren Nähe zur Membranoberfläche^b



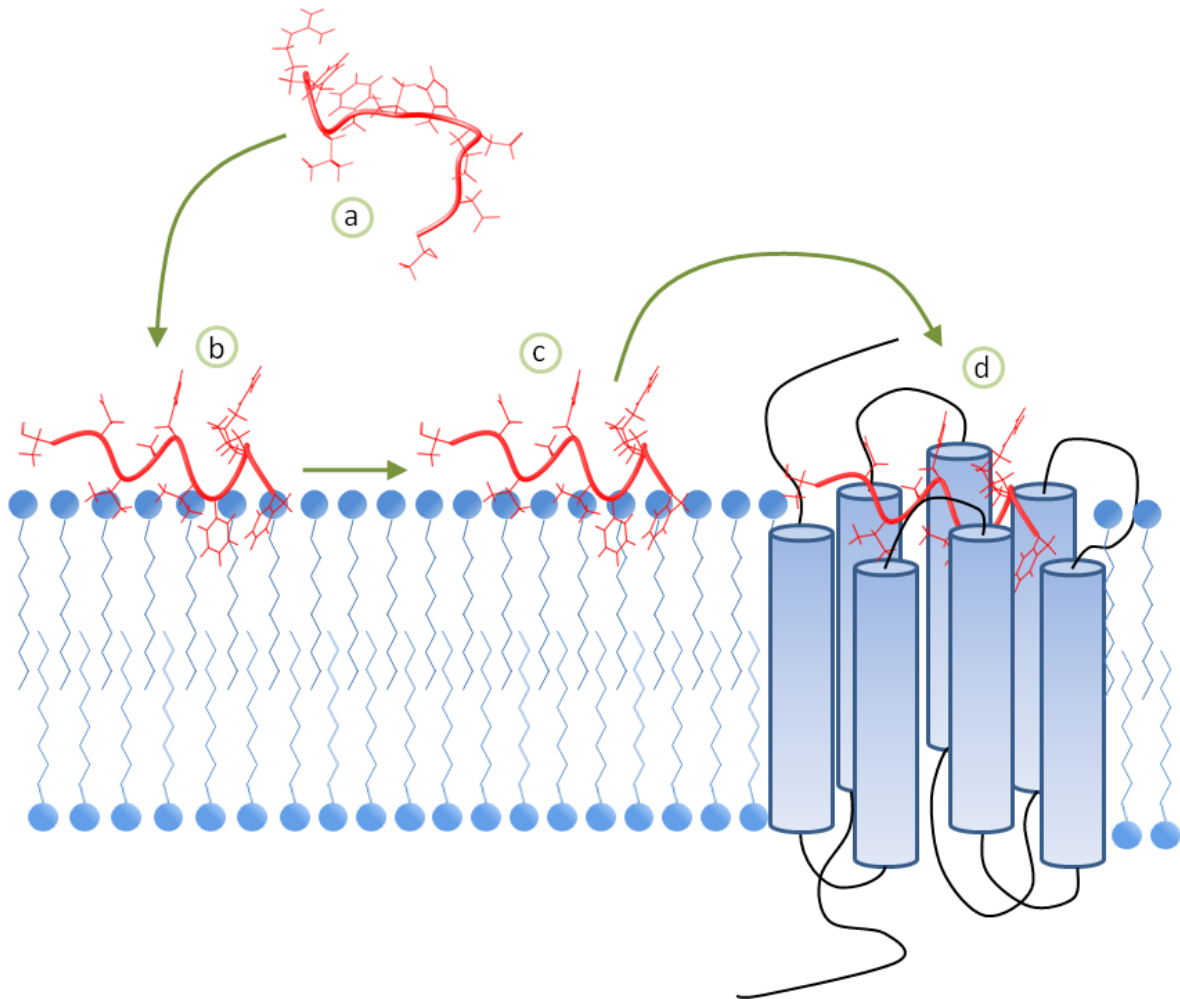
^b Abbildung von <http://www.scientificimages.co.uk/Proteins.htm>

2.2 Ermittlung der „biologisch aktiven“ Struktur

Für die Entwicklung biologisch aktiver Neuropeptid-Mimetika wäre die Kenntnis der rezeptorgebundenen Konformation eine ideale Voraussetzung. NMR-Untersuchungen in wässrigen Lösungen wurden erfolgreich für Bindungen von Liganden an die lange extrazelluläre Domäne von GPCR's der Familie 2 etabliert. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung von Astressin an den CRF-R2 β -Rezeptor.^[58] Weiterhin wurde die Konformationen des PACAP,^[59] Neurotensins^[60] und die Backbonestruktur des Bradykinins^[61] im rezeptorgebundenen Zustand aufgeklärt. Für alle anderen Neuropeptide sind bisher nur indirekte Informationen zur rezeptorgebundenen Konformation verfügbar. Dazu gehören ausführliche Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen sowie die Synthese kleiner cyclischer Peptide variabler Ringgröße, wodurch relevante Sekundärstrukturen „eingefroren“ werden. Diese Cyclen können leicht mittels konventioneller NMR-Spektroskopie analysiert werden (S. 27).^[62]

Ein anderer, häufig verwendeter Ansatz für Neuropeptide ist ihre Konformationbestimmung im membrangebundenen Zustand. Die Grundidee basiert auf Arbeiten von Schwyzer *et al.* zur Opioid- und Neurokinin-Rezeptor-Subtyp Erkennung. Gemäß des Membran-Kompartiment Modells^[63-68] ist die Rezeptorerkennung ein mehrstufiger Prozess, der maßgeblich durch die Zellmembran beeinflusst wird. Für die Bindung an die Membran spielen besonders elektrostatische Anziehungskräfte eine Rolle.^[69] Durch Bindung des Neuropeptids an die Membran wird zum einen die Rezeptorsuche auf einen zweidimensionalen Prozess reduziert, das heißt auf die Wanderung des Peptids auf der Zellmembran. Dies führt zu einer Erhöhung der Peptidkonzentration in der Umgebung des Rezeptors. Zum anderen wird eine Konformation und Orientierung des Peptids induziert, die die stereochemischen und strukturellen Anforderungen des Rezeptors besser erfüllt als die flexiblen Konformationen der Peptide in wässriger Lösung. Die membrangebundene Konformation wird vom Rezeptor erkannt und das Peptid kann an die entsprechende Bindungstasche binden. Weitere konformative Änderungen während der Rezeptorbindung und Konformationsänderungen gemäß eines „Induced-Fit“-Mechanismus können auch bei diesem Modell nicht ausgeschlossen werden. Dennoch sollte die Ähnlichkeit der rezeptorgebundenen zur membrangebundenen Konformation größer sein, als zur Konformation der Peptide in rein wässriger Lösung.^[63-67,70,71] Weitere Untersuchungen, die eine Rezeptorerkennung aus dem membrangebundenen Zustand unterstützen, wurden an Peptiden der Neuropeptid Y-Familie^[68] und der Cholecystokinine^[72,73] durchgeführt. Innerhalb der letzten beiden Dekaden wurden die Konformationen mehrerer weiterer Neuropeptide wie Bradykinin,^[61,74] der Endomorphine^[75], Enkephaline^[76] und Hemopressin^[77] mittels NMR-Untersuchungen an artifiziellen Membranen aufgeklärt.

Abb. 9: Mechanismus der Rezeptorbindung: a) Unstrukturiertes, flexibles Peptid in Lösung; b) Membranebundenen Peptid, Induktion einer Vorzugskonformation; c) Diffusion des Peptids zum Rezeptor; d) Rezeptorgebundenen Peptid



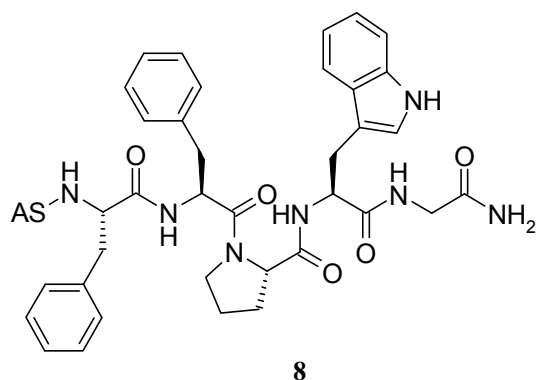
2.3 Rezeptorbindung der Kinine – Stand der Forschung

Seit der Isolierung der ersten Kinine im Jahre 1986 aus der Schabe *Leukophaea maderae*^[78] wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, mit dem Ziel die strukturellen Voraussetzungen der Peptide für eine erfolgreiche Rezeptorbindung zu ermitteln. Mit diesen Untersuchungen besonders verbunden ist der Name R. J. Nachman. Ein Großteil der durchgeführten Struktur-Wirkungs-Untersuchungen beruht auf biologischen Testsystemen an isolierten Organen. In letzter Zeit wurden jedoch auch vermehrt biologische Screenings mit Rezeptor-Assays durchgeführt.^[79,80] Organ-Assays besitzen für die Erarbeitung eines validen Rezeptormodells einige grundlegende Probleme, die in Abschnitt 5 näher erläutert werden (S. 17).

Tabelle 1: Myokinine verschiedener Insekten-Spezies

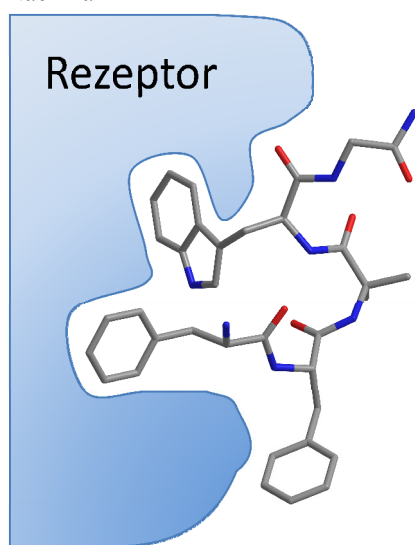
Insekten-Spezies	Name	Sequenz	
Grille	<i>Acheta domesticus</i>	Achetakinin I	Ser-Gly-Ala-Asp- Phe Tyr-Pro- Trp-Gly -NH ₂
		Achetakinin II	Ala-Tyr- Phe -Ser-Pro- Trp-Gly -NH ₂
		Achetakinin III	Ala-Leu-Pro- Phe -Ser-Ser- Trp-Gly -NH ₂
Mücke	<i>Aedes aegypti</i>	Aedeskinin I	Asn-Ser-Lys-Tyr-Val-Ser-Lys-Gln-Lys- Phe -Tyr-Ser- Trp-Gly -NH ₂
		Aedeskinin II	Arg-Pro- Phe -His-Ala- Trp-Gly -NH ₂
		Aedeskinin III	Arg-Arg-Pro-Arg-Val- Phe -Tyr-Pro- Trp-Gly -NH ₂
Mücke	<i>Culex salinarius</i>	Culekinin I	Arg-Pro- Phe -His-Ser- Trp-Gly -NH ₂
		Culekinin II	Arg-Arg-Ala-Arg-Val- Phe -Tyr-Pro- Trp-Gly -NH ₂
		Culekinin III	Trp-Lys-Tyr-Val-Ser-Lys-Gln- Phe -Phe-Ser- Trp-Gly -NH ₂
Motte	<i>Heliothis zea</i>	Helicokinin I	Tyr- Phe -Ser-Pro- Trp-Gly -NH ₂
		Helicokinin II	Val-Arg- Phe -Ser-Pro- Trp-Gly -NH ₂
		Helicokinin III	Lys-Val-Lys- Phe -Ser-Ala- Trp-Gly -NH ₂
Schabe	<i>Leucophaea maderae</i>	Leucokinin I	Asp-Pro-Ala- Phe -Asn-Ser- Trp-Gly -NH ₂
		Leucokinin II	Asp-Pro-Gly- Phe -Ser-Ser- Trp-Gly -NH ₂
		Leucokinin III	Asp-Gln-Gly- Phe -Asn-Ser- Trp-Gly -NH ₂
Heuschrecke	<i>Locusta migratoria</i>	Locustakinin	Ala- Phe -Ser-Ser- Trp-Gly -NH ₂

Nichtsdestotrotz wurde als Kernsequenz zum Erhalt der vollen biologischen Aktivität der Kinine mehrfach das C-terminale Pentapeptid Phe-X¹-X²-Trp-Gly-NH₂ beschrieben.^[9,29,81,82] Alanin-Scans sowohl der Helicokinine^[29] als auch der Leukokinine^[83] zeigten besonders die Seitenketten des Tryptophans und Phenylalanins als wichtige Gruppen. Dagegen ist besonders der Austausch der Aminosäuren in Position 2 und 3 der Kernsequenz tolerierbar und diese Aminosäuren variieren auch in den natürlichen Kininen.^[82,84] Das C-terminale Amid ist, wie bei vielen anderen Neuropeptiden,^[85] relevant für die erfolgreiche Rezeptoraktivierung. Der N-Terminus hingegen zeigt eine hohe Toleranz hinsichtlich der Verknüpfung mit einer Vielzahl verschiedener Aminosäuren. So wurden Hexapeptide **8** mit einem variablen N-Terminus synthetisiert und auf ihre Wirkung im Ramsay-Assay (S. 17) an isolierten malpighischen Gefäßen der Grille getestet.^[86] Derivate mit Asp, Leu, Asn und Val zeigten, verglichen mit dem natürlichen Achetakinin, sogar superagonistische Wirkung. Molekular-Dynamik Simulationen am Leucokinin II (Asp-Pro-Gly-Phe-Ser-Ser-Trp-Gly-NH₂, **9**) lieferten Hinweise auf eine β -Turn Struktur, gebildet aus den Aminosäuren Phe-Ser-Ser-Trp. Ähnliche β -Turns wurden für die Kernsequenzen der Leukokinine (Phe-X-Ser-Trp-Gly-NH₂) und Achetakinine (Phe-X-Pro-Trp-Gly-NH₂) postuliert.^[83]

Abb. 10: Kinin-Analoga mit variierendem *N*-Terminus**Tabelle 2:** Variation der *N*-terminalen Aminosäuren von **8**

AS	EC ₅₀ (nM)
--	0.1
Trp	0.042
Phe	0.029
Arg	0.020
Ala	0.005
Lys	0.005
Aib	0.005
Asp	0.002
Leu	0.002
Asn	0.001
Val	0.001

Diese Berechnungen wurden ohne die explizite Einbeziehung eines Lösungsmittels durchgeführt. Kleine lineare Peptide bilden jedoch in wässriger Lösung in der Regel keine definierten Sekundärstrukturen aus und liegen in gestreckten, flexiblen, wenig strukturierten Konformationen vor.^[87] Daher ist die Signifikanz dieser Analysen für Konformationen der Kinine in biologischen Systemen fraglich. NMR-basierte Studien in wässriger Lösung wurden bisher am cyclischen Achetakinin-Derivat cyclo(Ala-Phe-Phe-Pro-Trp-Gly, **10**) durchgeführt. Das Cyclopeptid **10** zeigte im Ramsay-Assay von *A. domesticus* und myotropen Assay an Enddärmen von *L. maderae* eine merkliche, jedoch im Vergleich zur Kernsequenz deutlich reduzierte, Aktivität (Faktor 50 und 1600).^[88] Die NMR-Analyse lieferte ein Gemisch zweier ver-

Abb. 11: qualitatives Modell der Rezeptorbindung der Myokinine nach Nachman

schiedener Turn-Strukturen. Durch Molekular-Dynamik Simulationen wurde hauptsächlich ein 1-4 *cis*Pro VI β -Turn (über die Kern-Sequenz Phe¹-Gly⁵) gefunden. Ein 2-5 *trans*Pro I β -Turn konnte durch die Berechnung jedoch nicht ausgeschlossen werden.^[89,90]

Untersuchungen linearer Kinine wurden bisher am Analogon Phe-Phe-Aib-Trp-Gly-NH₂ (**11**) durchgeführt, jedoch wurde eine definitive Konformation aufgrund der begrenzten NOE-Daten nicht erhalten. Weiterführende MD-Studien in wässrigem Medium stützen die im Cyclopeptid **10** gefundenen Turns als Vorzugskonformere.^[91] Das größtenteils auf der Vorzugskonformation des Cyclopeptids **10** basierende Bindungsmodell postu-

liert eine Bindung an den Rezeptor über die Seitenketten Phe¹ und Trp⁴, die sich auf der gleichen Seite des Peptidrückgrats befinden. Die variablen Aminosäuren in 2 und 3 Position befinden sich auf der Rezeptorabgewandten Seite (Abb. 11).

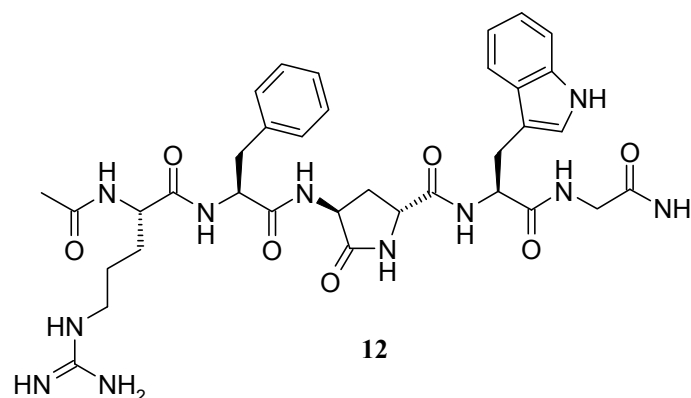
Austausch der Aminosäuren in Position 2 und 3 der Kern-

sequenz durch Dipeptid-Mimetika mit einer *cis*-Amidbindung, wie Aminopyroglutamat- und Tetrazolbausteine führten zu biologisch aktiven Kinin-Derivaten (**12**).^[92-95] Dieses Ergebnis weist auf einen 1-4 VI β -Turn hin, kann aber eine mögliche Relevanz des 2-5 I β -Turns nicht widerlegen. Genauso gut können diese Dipeptid-Mimetika ideale, unfunctionalisierte Abstandhalter der pharmakophoren Gruppen Phe¹ und Trp⁴ darstellen. Dennoch bleibt die Frage ungeklärt, wie gut diese Modelle die strukturellen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Rezeptorbindung widerspiegeln.

Das von Nachman erstellte Modell der Rezeptorbindung basiert größtenteils auf Molekular-Modelling Untersuchungen von Peptiden in der Gasphase, die Einflüsse von Lösungsmitteln und Bestandteilen des biologischen Systems werden hierbei nicht berücksichtigt. Das Cyclopeptid **10**, aus dessen Untersuchungen der VI β -Turn als aktives Strukturelement postuliert wurde, erwies sich in den Organ-Assays als deutlich inaktiver verglichen zur Achetakinin-Kernsequenz. Neben der beschriebenen Relevanz des amidierten C-Terminus für die Signal-Transduktion ist auch eine ungünstige Konformation der Cyclopeptide eine plausible Erklärung für die verminderte biologische Wirkung.^[83]

Betont werden muss, dass für die bisher durchgeführten biologischen Untersuchungen größtenteils artfremde Insektenorgane und Rezeptoren zum Einsatz kamen. Dadurch sind Fehlinterpretationen aufgrund erheblicher Unterschiede zwischen den Spezies möglich. Ein Austausch von Gly gegen Ala in Position 5 der Kinin-Kernsequenz zeigt an isolierten Kinin-Rezeptoren von *Boophilus microplus* keinen Einfluss, wohingegen der Rezeptor von *Aedes aegypti* äußerst empfindlich auf Änderungen des C-terminalen Glycins reagiert.^[79] Neben den generellen Problemen der Organ-Assays (S. 17) ist zusätzlich zu beachten, dass besonders cyclische Peptide oft als Ionophore wirken. Dies kann Ursache für falsch positive Ergebnisse sein. Für die Erarbeitung eines validen Rezeptormodells sowie der effektiven Entwicklung

Abb. 12: Kinin-Analogon **12** mit Mimetikum einer *cis*-Amidbindung



von Peptidomimetika erscheinen biologische Screenings an einem der Zielspezies zugehörigen Rezeptor als unverzichtbare Voraussetzung.

3. Sekundärstrukturelemente von Peptiden

Sekundäre Strukturelemente spielen in Peptiden und Proteinen eine außerordentlich wichtige Rolle, sei es als biologisch aktive Strukturen oder als passive, für die Peptidfaltung wichtige, Strukturelemente. Häufig vorkommende Strukturelemente sind α -Helices, β -Faltblätter und Turn-Strukturen, die durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden.

α -Helices und β -Faltblattstrukturen sind die Hauptbestandteile von Proteinstrukturen. So sind beispielsweise in den GPCR's sieben Helices für die Verankerung in der Membran verantwortlich. Ein drittes wichtiges Sekundärstrukturelement stellen Turn-Strukturen dar. Hochaufgelöste Kristallstrukturanalysen von Antikörper-Peptid-Komplexen^[96-98] und Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen einer Vielzahl von Peptiden wie Angiotensin II,^[99,100] Bradykinin,^[101] Cholecystokinin^[102] und Somastotatin^[103,104] belegen die Bedeutung von Turns als Erkennungsmotiv für Wechselwirkungen mit anderen Peptiden und Rezeptoren. Ein Turn definiert sich durch einen kompletten Richtungswechsel einer Peptidkette um 180° . Turns werden hierbei je nach Anzahl der beteiligten Aminosäuren differenziert, wobei der β -Turn mit vier Aminosäuren vor dem γ -Turn mit drei Aminosäuren am häufigsten anzutreffen ist.^[105] Stabilisiert werden die Turns durch eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff in Position i und dem

Abb. 13: Aminosäurenomenklatur von β -Turns (links) und γ -Turns (rechts)

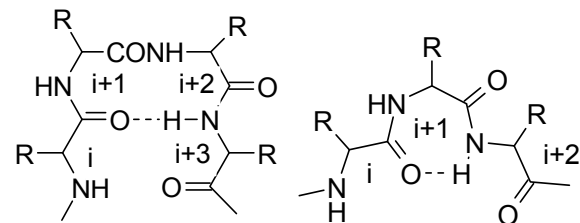
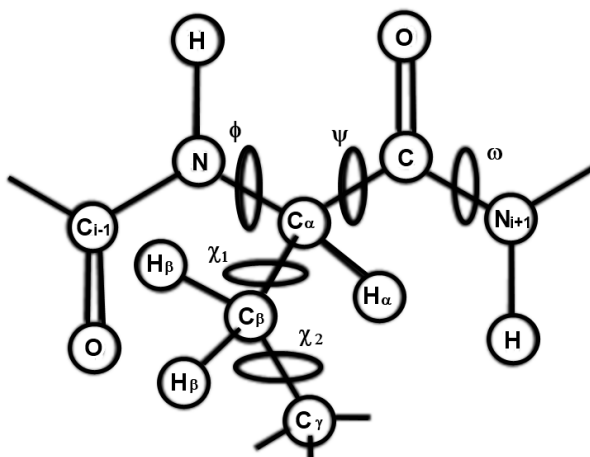


Abb. 14: Diederwinkel am Peptidrückgrat



Amidproton der Aminofunktion der Aminosäure $i+3$ (β -Turn) bzw. $i+2$ (γ -Turn). Generell können das Peptidrückgrat sowie die Seitenketten eines Proteins bzw. Peptides anhand ihrer dihedralen Winkel definiert werden. Der Winkel ω ist aufgrund der Planarität der Amidbindung festgelegt und beträgt in der Regel 180° (*trans*-Isomer).

Das *cis*-Isomer ($\omega = 0^\circ$) ist um $\Delta G^\circ = 2.6 \text{ kcal/mol}$ ungünstiger und sein

Anteil beträgt zwischen 0.1 und 1.5 %.^[106] Tertiäre Amide wie Xaa-Pro-Bindungen besitzen eine deutlich geringere Energiedifferenz von $\Delta G^\circ = 0.5$ kcal/mol, wodurch ein erheblicher Anteil von bis zu 30 % in kleinen Peptiden als *cis*-Isomer vorliegt.^[106,107] Der Diederwinkel ϕ beschreibt die Drehung um die N-C $_{\alpha}$ -Bindung, der Torsionswinkel ψ die Drehung um die C $_{\alpha}$ -CO Bindung und

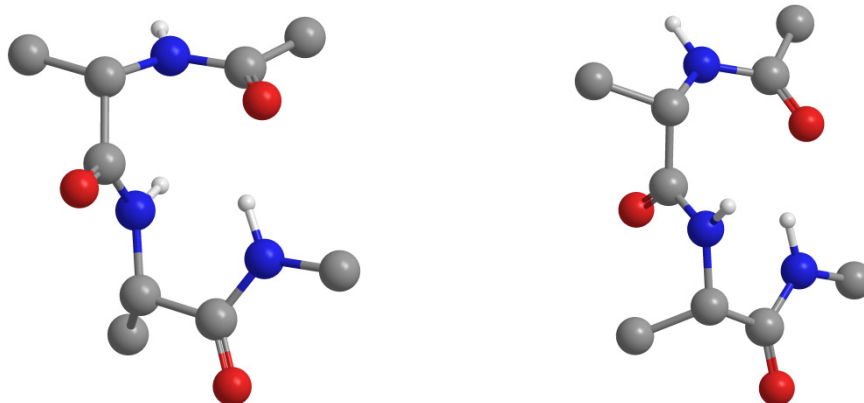
die Torsionswinkel χ_1 bis χ_x legen die Konformation der Seitenkette fest. Anhand der Torsionswinkel ϕ und ψ der Aminosäuren $i+1$ und $i+2$ werden β -Turns in verschiedene Typklassen unterteilt. Erstmals erfolgte die Unterteilung in die Typen I, II und III und deren Inverse I', II' und III' durch Venkatachalam.^[108] Mittlerweile wurde die Klassifizierung um die Typen IV, V, VI, VII und VIII erweitert (Tabelle 3).^[109-111] Entgegen der ursprünglichen Definition ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung keine notwendige Voraussetzung für die Bildung eines β -Turns, weswegen die Bezeichnung des „open-turns“ eingeführt wurde.^[112] Da die idealen Winkel in Konformationsanalysen nur in wenigen Fällen beobachtet werden konnten, wurde die Definition zur Klassifizierung der Turns erweitert.^[109,111]

- die Torsionswinkel dürfen von den idealen Werten um bis zu 30° abweichen, ein Winkel sogar bis zu 45° ,
- der Abstand zwischen den Atomen C $_{\alpha}$ und C $_{\alpha+3}$ muss ≤ 7 Å sein und
- der betrachtete Abschnitt darf nicht Bestandteil einer Helix sein.

Tabelle 3: Torsionswinkel häufig auftretender β -Turn-Konformationen

Turn	Φ_{i+1} [°]	Ψ_{i+1} [°]	Φ_{i+2} [°]	Ψ_{i+2} [°]
β I	-60	-30	-90	0
β I'	60	30	90	0
β II	-60	120	80	0
β II'	60	-120	-80	0
β III	-60	-30	-60	-30
β III'	60	30	60	30
β IV	Turns des Typs β I- β III' mit Abweichung in zwei oder mehr Winkeln über 40°			
β VI	<i>cis</i> -Prolin in Position $i+2$			

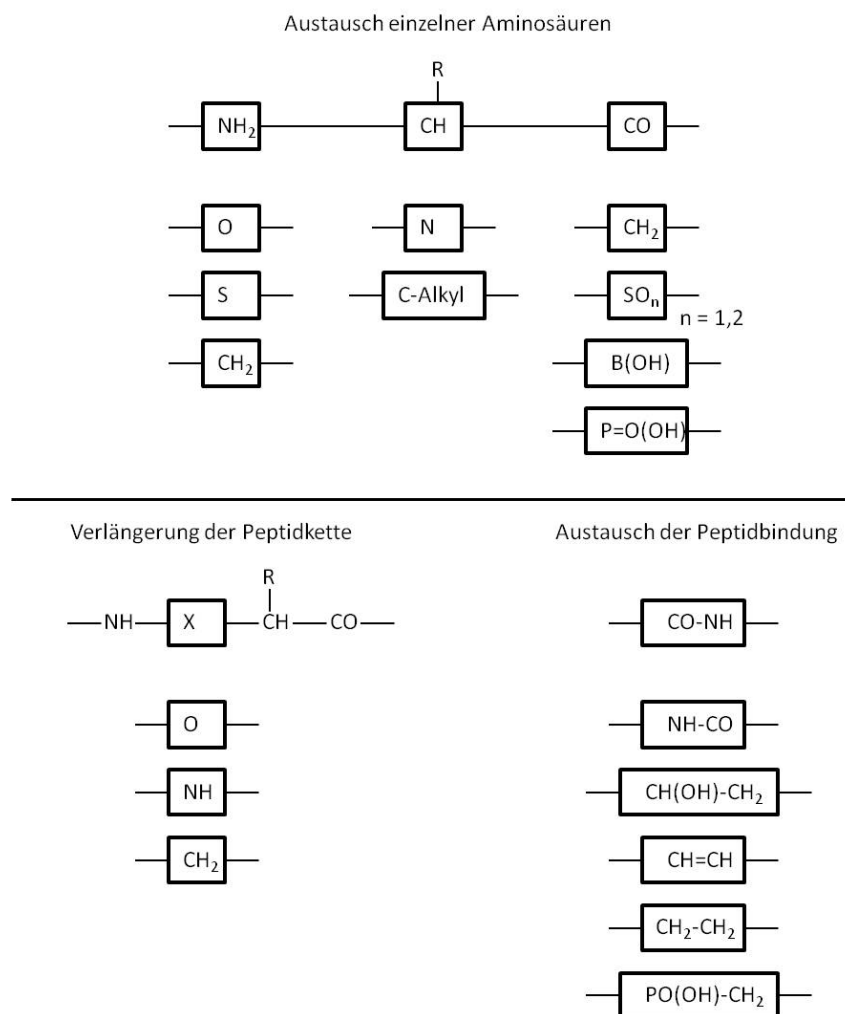
Abb. 15: Ideale Struktur eines I β -Turns (links) und II β -Turns (rechts)



4. Stabilisierung von Sekundärstrukturen – Peptidomimetika

Seitdem Peptidhormone als potenzielle Leitstrukturen für die Pharmaforschung in den Blickpunkt gerückt sind, hat es nicht an Versuchen gefehlt, die Sekundärstrukturen zu stabilisieren und in nicht bzw. weniger peptidische Strukturen zu überführen. Hinsichtlich der nachteiligen pharmakologischen Eigenschaften von natürlichen Peptiden (S. 3) werden an Peptidmimetika folgende Anforderungen gestellt: (a) hohe Rezeptoraffinität und Selektivität, (b) hohe metabolische Stabilität und (c) eine hohe Bioverfügbarkeit.^[113] Zur Optimierung dieser Parameter wurden zahlreiche Ansätze entwickelt, unter anderem die Modifikation einzelner Aminosäuren, von Dipeptiden oder des Peptidrückgrats. Weitere häufig verwendete Ansätze sind die konformative Einschränkung der Peptide durch Cyclisierung und die Imitation der Sekundärstrukturen. Die häufigsten Modifikationen des Peptidrückgrats sind in Abb. 16 wiedergegeben.^[114]

Abb. 16: Häufig verwendete Modifikationen des Peptidrückgrats



Alle aufgeführten Modifikationen verhindern den metabolischen Abbau der Peptide, weil die unnatürlichen Aminosäuren keine geeigneten Substrate für Peptidasen darstellen. Die Verbrückung zweier benachbarter Aminosäuren führt zu Dipeptidmimetika mit eingeschränkter Konformation. Durch die Verwendung von Lactamen und Piperazinonen konnten schon mehrfach bioaktive Derivate erhalten werden.^[113,115-117] Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Synthese von Sekundärstrukturmimetika. Diese Bausteine sollen die gewünschte Konformation möglichst genau imitieren und eine breite Funktionalisierbarkeit besitzen, so dass verschiedenste Aminosäureseitenketten angebracht werden können. β -Turn-Mimetika lassen sich in interne und externe Mimetika einteilen, je nachdem ob die Templat-Atome innerhalb oder außerhalb der Rückgrat-Atome des β -Turns liegen. Mittlerweile wurde eine Vielzahl verschiedener Turn-Mimetika synthetisiert, dennoch stellt die Adressierung spezifischer Turns immer noch eine große Hürde dar.

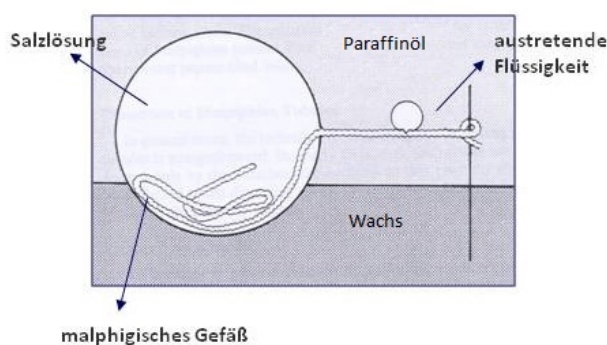
Das „Conformational Design“ zur Auswahl geeigneter Scaffolds setzt ein breites Wissen über die räumliche Anordnung der für die Rezeptorbindung erforderlichen funktionellen Gruppen voraus. Unterstützt durch die Vielzahl bereits synthetisierter und strukturell analysierter Scaffolds kann das Grundgerüst gewählt und mit geeigneten Funktionalitäten versehen werden, das den strukturellen Anforderungen an das Mimetikum am Besten entspricht.^[118]

5. Biologische Testsysteme

Ursprünglich wurden die Kinine anhand ihrer myotropen Aktivität an isolierten Enddärmen von *Leucophaea maderae* isoliert.^[78] Für die Messung der diuretischen Effekte wird üblicherweise der Ramsay-Assay verwendet.^[119]

Dieser wird an isolierten malpighischen Gefäßen der Testinsekten durchgeführt. Diese Gefäße sind die Exkretionsorgane der Insekten und an der Regulation des Wasserhaushaltes beteiligt. Sie sind Ausstülpungen, die zwischen Mitteldarm und Enddarm in den Verdauungstrakt mün-

Abb. 17: schematische Durchführung des Ramsay-Assays



den. Für den Ramsay-Assay werden die Organe isoliert und in einem Tropfen einer Salzlösung unter flüssiges Paraffin gebracht. Die Salzlösung enthält zusätzlich die gelöste Testsubstanz. Ein Ende der malpighischen Gefäße wird aus der Salzlösung herausgezogen, um eine Nadel gewickelt und angeschnitten. Aus der an diesem Schnitt austretenden Flüssigkeitsmenge, verglichen zu einer Refe-

renzmessung mit purer Salzlösung, können Rückschlüsse auf die diuretische Aktivität der Testsubstanzen gezogen werden.^[120]

Organ-Assays bergen für die Erarbeitung eines validen Rezeptormodells jedoch einige grundlegende Probleme:

- die Aktivierung verschiedener funktionell ähnlicher Rezeptoren ist möglich, wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse abgeschwächt wird,
- Testsubstanzen können aktiv aus den Zellen ausgeschleust werden - dies führt zur Fehlinterpretation der Ergebnisse,
- eine Neurotoxizität von Testsubstanzen kann zum Vortäuschen falsch positiver Ergebnisse führen und
- die Beeinflussung von Ionenkanälen kann ebenfalls zu einer biologischen Antwort führen.

Zusätzlich zu diesen Problemen sind Organ-Assays nicht hochdurchsatzfähig, da die biologische Untersuchung einer hohen Anzahl an Testsubstanzen unzählige lebende Insekten benötigt. Die Präparierung der Organe ist zeitaufwendig und nicht parallelisierbar.

Alle biologischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an einem funktionellen *Heliothis virescens* Helicokinin Rezeptor-Assay durchgeführt.^[121] Über die Aktivierung der Second-Messenger Kaskade wurde ein Calcium-Ionenfluss in das Zytosol induziert. Dieser wurde durch Calcium-Ionen-sensitive Farbstoffe mittels Fluoreszenz ausgelesen und daraus die EC₅₀-Werte ermittelt. Die biologischen Untersuchungen wurden von der Firma Bayer CropScience durchgeführt.

III Zielsetzung

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit ist die Entwicklung eines validen Bindungsmodells der Helicokinine. Mit dem Kinin-Rezeptor-Assay von *Heliothis virescens* steht ein hochdurchsatzfähiges Testsystem dieses ökonomisch relevanten Schadinsekts zur Verfügung. Dadurch sind die Ergebnisse wesentlich aussagekräftiger als Organ-Assays und Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an Insekten einer anderen Art. Das Bindungsmodell soll sowohl über klassische Ansätze wie diverse Aminosäurescans, aber auch Konformationsuntersuchungen der Neuropeptide und ausgewählter Derivate an artifiziellen Membranen erarbeitet werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der konformativen Stabilisierung von Vorzugskonformationen durch Synthese kleiner cyclischer Helicokinin I-Analoga. Deren biologische Bedeutung soll über Konformationsanalysen und biologische Ergebnisse evaluiert werden. Basierend auf diesen Vorzugskonformationen sollen niedermolekulare Scaffolds synthetisiert werden, die das wirkungsstärkste Cyclopeptid imitieren.

Im dritten Teil sollen, basierend auf der membrangebundenen Konformation, geeignete Sekundärstrukturmimetika ausgewählt, synthetisiert und in das Helicokinin I integriert werden. Konformationsanalysen der synthetisierten Helicokinin I-Analoga, in Kombination mit deren biologischen Ergebnissen im Rezeptor-Screening, sollen zur Aufklärung der Wirkungsweise der Helicokinine beitragen.

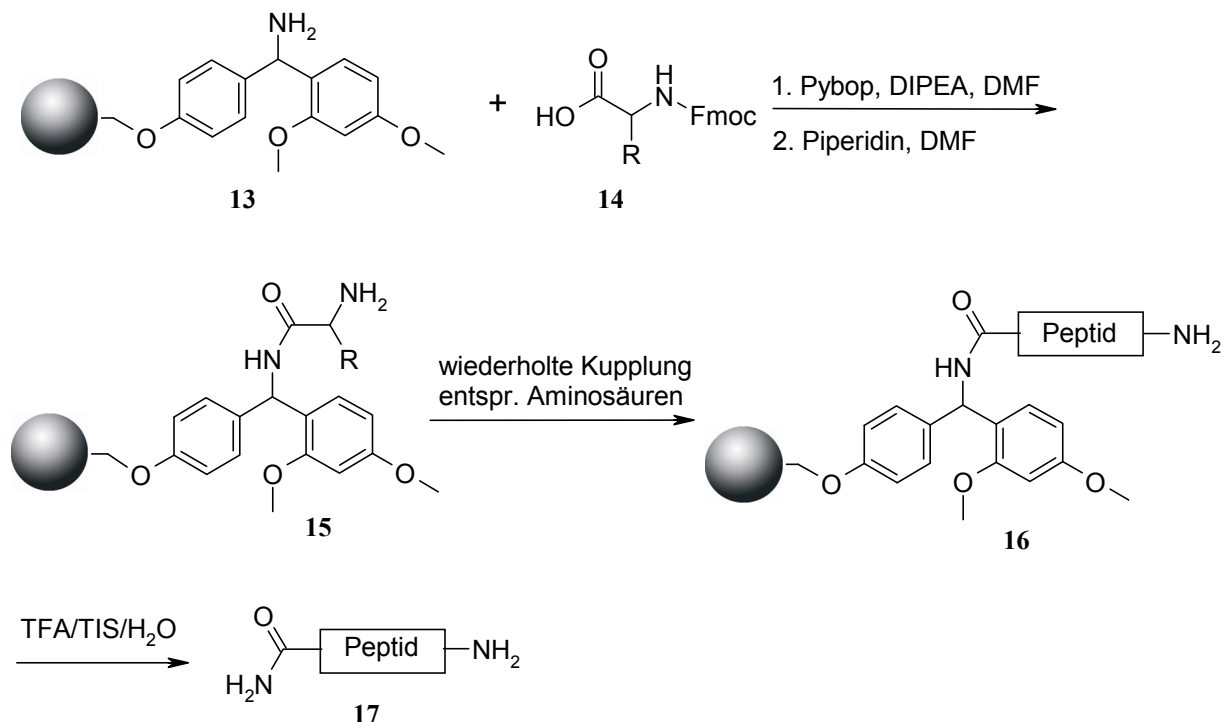
IV Ergebnisse und Diskussion

1. Struktur-Wirkungsuntersuchungen linearer Helicokinin I-Analoga

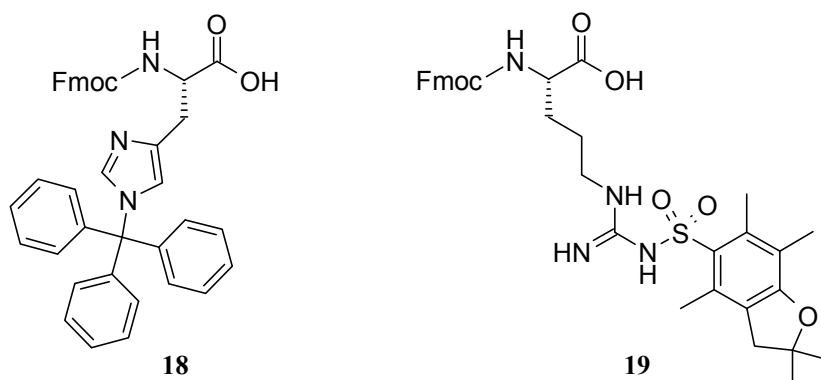
Für die Helicokinine sind bisher vereinzelte Struktur-Wirkungs-Beziehungen bekannt, diese wurden jedoch an Organ-Assays durchgeführt. Mittlerweile wurde der Helicokinin I-Rezeptor von der Firma Bayer CropScience funktionell kloniert.^[121] Damit steht erstmalig ein hochdurchsatzfähiges Assaysystem für die systematische Erarbeitung qualitativer Struktur-Wirkungs-Untersuchungen direkt am Helicokinin-Rezeptor zur Verfügung. Für die Beurteilung möglicher struktureller Modifikationen des Peptids werden häufig Alanin- und D-Aminosäurescans, Deletionsscans und *N*-Methylaminosäurederivate verwendet.^[122]

1.1 Synthese linearer Neuropeptide und linearer Helicokinin I-Analoga

Seit den Arbeiten von Merrifield in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts hat sich die Festphasensynthese stetig weiterentwickelt und ist mittlerweile nicht nur zur Synthese von Polypeptiden sondern auch als Alternative zur Synthese organischer Moleküle in Lösung etabliert.^[123-125] Für seine bahnbrechenden Arbeiten wurde Merrifield im Jahre 1984 mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet. Bei der Peptidsynthese an der Festphase wird die erste Aminosäure am *C*-Terminus an das polymere Trägermaterial gebunden und das Peptid sukzessive durch die Anbindung weiterer Aminosäuren aufgebaut, das Trägermaterial fungiert gleichzeitig als Schutzgruppe für das *C*-terminale Ende des Peptids. Den besonderen Charme der Festphasensynthese stellt der Wegfall aufwändiger Reinigungsprozeduren dar, da das Trägermaterial durch einfache Filtrations- und Waschprozesse von überschüssigen Edukten sowie Nebenprodukten befreit werden kann. Durch den Einsatz hoher Eduktüberschüsse werden somit höhere Ausbeuten erreicht. Diese Vorteile ermöglichen eine, verglichen mit der Lösungssynthese, deutlich schnellere und effizientere Herstellung von Peptiden. Eine entscheidende Rolle in der Festphasenchemie kommt der Wahl der geeigneten Schutzgruppenstrategie und des Trägermaterials zu. Da es sich bei den zu synthetisierenden Peptiden um endständig amidierete Neuropeptide handelt, ist die Verwendung des Rink-Amid-Linkers vorteilhaft.^[126,127] Dieser Linker ermöglicht nach dem sukzessiven Aufbau des Peptids unter Verwendung der Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie, die bei kurzen Peptiden die Methode der Wahl ist, die Abspaltung des Produkts mit TFA vom Harz als *C*-terminales Amid. Die schematische Synthese eines Peptides am Rink-Amid Harz (**13**) ist in Schema 1 dargestellt.

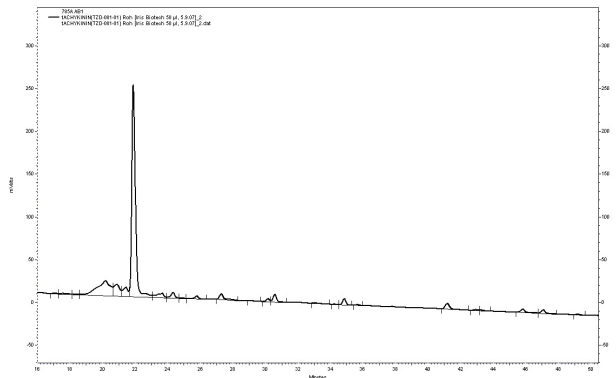
Schema 1: Beispiel der Synthese eines Peptids am Rink-Amid Harz

Die Synthese der Peptide wurde unter PyBOP-Aktivierung durchgeführt, wobei eine Doppelkupplung mit einem 2.5fachen Überschuss an Kupplungsreagenz und der Fmoc-Aminosäure verwendet wurde. Kupplungen an *N*-Methylaminosäuren wurden mit HATU durchgeführt, da dieses effizienter in der Kupplung an sekundäre Amine und sterisch gehinderter Aminosäurederivate ist als HOBT-basierte Reagenzien.^[128,129] Für die Synthese wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Fmoc-Aminosäuren mit säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen verwendet, so dass bei der Abspaltung der Peptide von der festen Phase gleichzeitig eine Entschützung der Seitenketten erfolgt. Hydroxyfunktionen wurden als *t*Bu-Ether, Säurefunktionalitäten als *t*Bu-Ester geschützt, Histidin wurde als Trityl-geschütztes^[130] Derivat Fmoc-His(Trt)-OH (**18**) und Arginin als Pbf-geschütztes^[131] Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**19**) eingesetzt.

Abb. 18: Fmoc-His(Trt)-OH (**18**) und Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**19**)

Am Rink-Amid Harz (**13**) wurden die endständig amidierten Neuropeptide Myosuppressin **3**, Tachykinin **4**, Helicokinin I **5**, die *N*-Methyl-Helicokinin I-Analoga **40-44** und das [Phe⁵]-Helicokinin I **51** synthetisiert (Kapitel 1.3). Die Synthese der *C*-terminal methylierten Helicokinin I-Derivate wird nach der Synthese der Cyclopeptide erläutert (S. 45), da diese aus einer gemeinsamen Vorstufe hergestellt wurden. Da für die Konformationsanalysen der Peptide ein

Abb. 19: HPLC-UV-Spektrum des Rohproduktes des Tachykinins



Reinheitsgrad >95 % notwendig ist, müssen die Peptide einer aufwändigen chromatographischen Reinigung unterzogen werden. Die Reinigung des Endprodukts stellt ein Hauptproblem der Festphasensynthese dar. Die Synthese erfolgt ohne Zwischenreinigungen, so dass alle Reaktionsschritte möglichst quantitativ verlaufen müssen. Ansonsten entsteht eine Vielzahl an Fehlsequenzen, die aufwändig

abgetrennt werden müssen. Die Nebenprodukte sind häufig Deletionssequenzen des gewünschten Peptids und besitzen daher eine ähnliche Polarität wie das Produkt. Deshalb ist eine chromatographische Trennung mittels präparativer bzw. semipräparativer Reversed-Phase HPLC notwendig (Abb. 19).

1.2 Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen linearer Helicokinin I-Analoga

Bisher sind nur unzureichende Struktur-Aktivitäts-Daten ökonomisch wichtiger Schädlinge vorhanden. Diese wurden vorrangig an Organ-Assays wie dem Ramsay-Assay^[120] oder dem „Cockroach-Hindgut-Assay“ erarbeitet.^[132] Der Ramsay-Assay lässt jedoch ungeklärt, ob die Neuropeptide bzw. deren Derivate spezifisch an einen Rezeptor binden oder eine eng verwandte Rezeptorfamilie aktivieren. Weiterhin kann in den *in vivo* Assays durch eine generelle Toxizität unnatürlicher Neuropeptid-Mimetika eine biologische Wirkung vorgetäuscht werden. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Struktur-Wirkungs-Untersuchungen. Soweit vorhanden sind zusätzlich die Ergebnisse der diuretischen Wirkung im Ramsay-Assay gegenübergestellt. Generell zeigten die Ergebnisse des Rezeptor-Assays eine gute Übereinstimmung mit denen des Ramsay-Assays^[120] und bestätigen das Helicokinin I (**5**) als das aktivste Neuropeptid, gefolgt von Helicokinin II (**6**) und Helicokinin III (**7**).

Tabelle 4: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Helicokinin I-Analoga

Verbindung	Sequenz	Ramsay-Assay [nl/min, 10 ⁻⁸ M]	Receptor-Assay EC ₅₀ [nM]
Helicokinin I (5)	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	7.3	2
Helicokinin II (6)	Val-Arg-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	6.2	5
Helicokinin III (7)	Lys-Val-Lys-Phe-Ser-Ala-Trp-Gly-NH ₂	4.8	5
verkürzte Helicokinin I-Analoga		/	
20	Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	5.2	240
21	Tyr-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	inaktiv
22	Tyr-Phe-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	inaktiv
23	Tyr-Phe-Ser-Trp-Gly-NH ₂	/	inaktiv
24	Tyr-Phe-Ser-Pro-Gly-NH ₂	/	inaktiv
25	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-NH ₂	/	inaktiv
26	Tyr-Phe-Ser-Pro-NH ₂	1.2	inaktiv
Alanin-Scan			
27	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp- Ala -NH ₂	0.8	inaktiv
28	Tyr-Phe-Ser-Pro- Ala -Gly-NH ₂	2.1	50
29	Tyr-Phe-Ser- Ala -Trp-Gly-NH ₂	6.0	3
30	Tyr-Phe- Ala -Pro-Trp-Gly-NH ₂	4.6	2
31	Tyr- Ala -Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	1.3	inaktiv
32	Ala -Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	5.5	3
D-Aminosäure-Scan			
33	Tyr-Phe-Ser-Pro- D-Trp -Gly-NH ₂	/	490
34	Tyr-Phe-Ser- D-Pro -Trp-Gly-NH ₂	/	2000
35	Tyr-Phe- D-Ser -Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	1400
36	Tyr- D-Phe -Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	3200
37	D-Tyr -Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	5
N-Methyl-Aminosäure-Scan			
38	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly- NHMe	/	630
39	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly- NMe₂	/	inaktiv
40	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp- NMeGly -NH ₂	/	inaktiv
41	Tyr-Phe-Ser-Pro- NMeTrp -Gly-NH ₂	/	inaktiv
42	Tyr-Phe- NMeSer -Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	425
43	Tyr- NMePhe -Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	380
44	MeHNTyr -Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	3
Verschiedene Derivate			
45¹⁾	Dppa -Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	10000
46²⁾	Alb -Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	32
47²⁾	Ald -Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	/	390
48³⁾	Tyr-Phe- Acapa -Trp-Gly-NH ₂	/	inaktiv
49³⁾	Tyr-Phe- Gly-Gly -Trp-Gly-NH ₂	/	1300
50³⁾	Tyr-Phe- Acyca -Trp-Gly-NH ₂	/	inaktiv
51	Tyr-Phe-Ser-Pro- Phe -Gly-NH ₂	/	inaktiv
52⁴⁾	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly- NH-NH₂	/	100

¹⁾ hergestellt von K. Brücher, ²⁾ hergestellt von H. Chen, ³⁾ hergestellt von D. Rehländer, ⁴⁾ hergestellt von C. van Tran.

Beachtliche Unterschiede wurden nur beim verkürzten Pentapeptid **20** festgestellt. Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH₂ (**20**) zeigte im Ramsay-Assay nur eine geringfügig verminderte Fluidsekretion, was im Einklang mit publizierten Daten verkürzter Peptid-Analoga anderer Insekten in

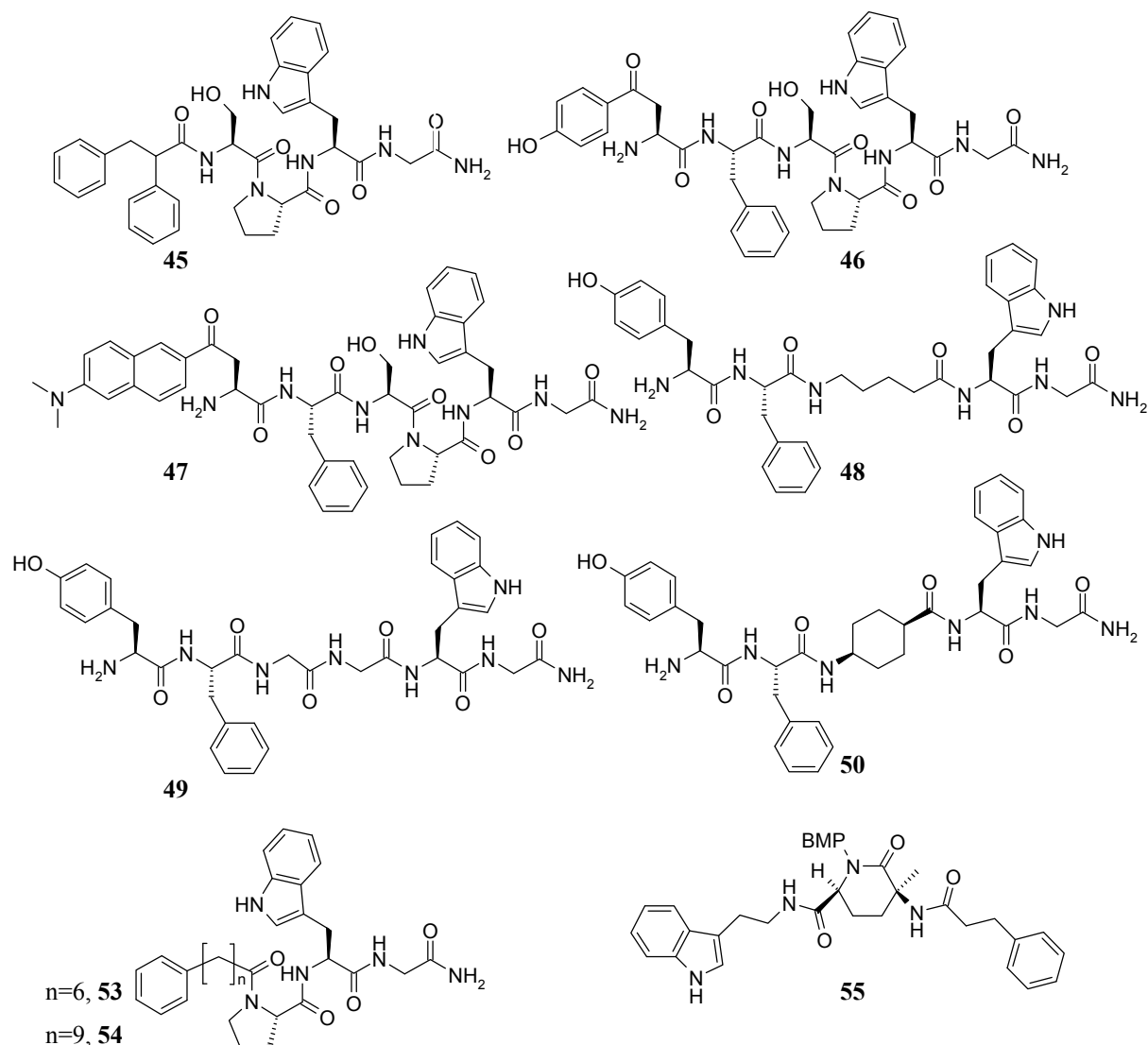
Organ-Assays steht.^[83] Im Rezeptor-Assay hingegen war die Aktivität um mehr als den Faktor 100 geringer. Dies belegt deutlich, dass ein vollständiges Hexapeptid für die volle Rezeptor-Aktivität notwendig ist, stärker verkürzte Analoga zeigen eine vollkommene Inaktivität. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Kinine^[30] erwiesen sich im Alanin-Scan Phenylalanin und Glycinamid als die wichtigsten Aminosäuren, gefolgt von Tryptophan, das die Rezeptor-Aktivierung um den Faktor 25-30 reduzierte. Die Notwendigkeit der Indol-Seitenkette wurde durch das Phenylalanin-Analogon **51** belegt, das überhaupt keine Rezeptor-Aktivierung zeigt. Die Seitenketten des Ser³ und Pro⁴ sind unkritisch für die Rezeptoraktivierung und scheinen als Spacer zwischen dem kritischen C-terminalen Dipeptid Trp-Gly-NH₂ und Phenylalanin zu fungieren. Der D-Aminosäure-Scan belegt darüber hinaus, dass Änderungen der Stereochemie, außer der des Tyrosins, stärkere Auswirkungen auf die Rezeptor-Aktivierung haben. Der Einbau von D-Trp in Position 5 führt zu einer Reduzierung um den Faktor 160, das D-Phe²-Derivat zeigt eine um den Faktor 1000 geringere Aktivierung. Besonders hervorgehoben werden muss hierbei, dass der Austausch der Aminosäuren Ser³ und Pro⁴ gegen ihre Enantiomere eine drastische Verringerung der Rezeptor-Aktivierung bewirkt. Wie schon beschrieben war der Austausch gegen L-Alanin in den Positionen 3 und 4 hingegen ohne Wirkungsverlust möglich. Dies legt eine Beteiligung dieser beiden Aminosäuren an einem sekundären Strukturelement nahe.

Basierend auf NMR-Messungen in wässrigen Lösungen wurde für verschiedene Kinine ebenfalls ein C-terminaler β -Turn als biologisch relevantes Strukturelement vermutet.^[88] Unterstützt wird dies durch den *N*-Methylaminosäurescan, bei dem Methylierungen der am Turn beteiligten Aminosäuren (Gly⁶, Trp⁵, Ser³) zu einem erheblichen Verlust der Aktivität führen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Ausbildung der Turn-stabilisierenden Wasserstoffbrücken nicht mehr möglich ist. Eine Methylierung des C-terminalen Amids (**38**) führt zu einer 300fach reduzierten Aktivität am Rezeptor, eine doppelte Methylierung (**39**) verursacht einen kompletten Verlust der Aktivität. Der Ersatz des C-terminalen Amids durch ein Hydrazid **52** reduziert die Rezeptoraktivierung um den Faktor 50. Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass in der Bindungstasche für den C-Terminus des Helicokinin I nur ein begrenzter Platz vorhanden ist. Zusätzlich ist ein Amid-gebundenes Proton nötig, das mit dem Rezeptor interagiert.

Laut Alanin- und D-Aminosäurescan ist weder die Stereochemie noch die Seitenkette des Tyrosins von Bedeutung. Dennoch scheint das Rückgrat des Tyrosins zum vollständigen Erhalt der biologischen Wirkung relevant zu sein, da die freie Aminogruppe in einen definierten

Abstand zum C-Terminus gelenkt wird und so eine Interaktion mit dem Rezeptor erst ermöglicht wird.

Abb. 20: Substituierte Kinin-Analoga



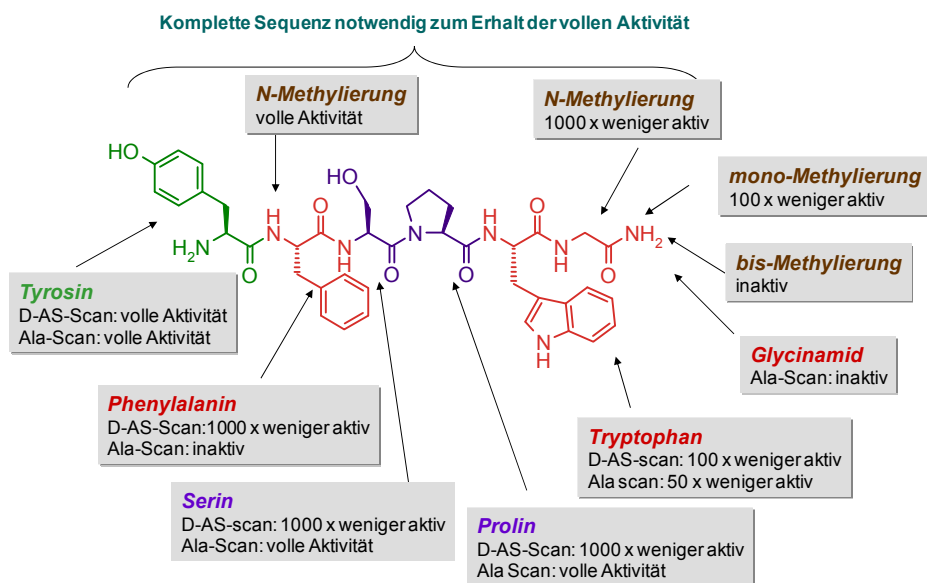
Weitere Einsichten in die funktionelle Rolle des Tyrosins wurden durch die von H. Chen dargestellten Helicokinin I-Analoga **46** und **47** erhalten.^[133,134] In diesen wurde Tyrosin durch die Aminosäuren Alb und Ald ersetzt. Für das Keto-Tyrosin Derivat **46** wurde eine geringfügig reduzierte Rezeptor-Aktivität gefunden, für das sterisch anspruchsvollere Ald-Analogon **47** wurde jedoch eine mehr als 100fach geringere Aktivität ermittelt. Dies weist auf einen beschränkten Platz der Tyrosin-Bindungstasche hin.^[134] Das Helicokinin-Analogon **45**, in dem das Dipeptid Tyr-Phe durch einen lipophilen 2,3-Diphenylpropanoyl-Rest ausgetauscht wurde, zeigte noch eine signifikante Aktivierung des Rezeptors im mikromolaren Bereich. Dies belegt, dass Modifizierungen des N-Terminus prinzipiell möglich sind. Durch den Einbau verfeinerter Tyr-Phe-Dipeptidmimetika sollte es möglich sein, eine deutlich gesteigerte Re-

zeptor-Aktivität zu erreichen. Um ein detaillierteres Bild über die Funktion der zentralen Aminosäuren zu erhalten, wurden Ser³ und Pro⁴ durch Bausteine unterschiedlicher Flexibilität ausgetauscht (Peptide **48**, **49** und **50**). Von den drei Derivaten zeigte ausschließlich das Gly-Gly-Analogon **49** eine schwache Rezeptoraktivierung ($EC_{50} = 1300 \text{ nm}$). Dies belegt die Wichtigkeit der chiralen Zentren der Aminosäuren in Position 3 und 4. Dennoch ermöglicht der Gly-Gly-Baustein die Bildung einer β -Turn-Struktur, jedoch mit deutlich höherer Flexibilität. Das zusätzliche Entfernen der internen Amid-Bindung führt zu einem vollkommenen Verlust der Aktivität (**48**). Im Gegensatz dazu konnten Achetakin-Analoga synthetisiert werden, die nach Austausch des *N*-terminalen Tripeptids gegen die lipophilen 7-Phenylheptanoyl- (**53**) sowie 10-Phenyldecanoyl-Reste (**54**) immer noch eine merkliche myotrope Aktivität im „Cockroach-Hindgut-Assay“ besitzen.^[84]

Die vollständige Wirkungslosigkeit des Aminocyclohexancarbonsäurederivats **50** kann durch die *cis*-Anordnung der Amino- und Carboxyfunktion erklärt werden. Dadurch wird eine Turn-Struktur gebildet, die sich erheblich von dem postulierten β -Turn des Helicokinin I unterscheidet. Im Jahre 2005 wurde von Borggraeve^[135] ein komplett nichtpeptidisches Kinin-Analogon **55** mit einem funktionalisierten *cis*-Piperidinon-Grundgerüst synthetisiert. Dieses zeigt im Ramsay-Assay eine moderate Aktivität. Aus den hier vorgestellten Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Mimetika mit einer *cis*-Anordnung der Substituenten ungeeignet als Mimetika für das Dipeptid Ser-Pro sind.

Diese Hypothese wird durch das Achetakinin-Analogon **12** unterstützt. Dieses besitzt ein *trans*-substituiertes Pyroglutamat als Dipeptidmimetikum und zeigt eine nahezu vollständig erhaltene Aktivität ($EC_{50} = 0.7 \text{ nm}$) im Ramsay-Assay der Grillen.^[93]

Abb. 21: Übersicht der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Helicokinin I-Analoga



2. NMR-Konformationsuntersuchungen der Insekten-Neuropeptide

Gemäß des Membran-Kompartiment Modells spielt die membrangebundene Konformation eine signifikante Rolle in der Rezeptor-Erkennung. Daher wurden Konformationsuntersuchungen der Neuropeptide Myosuppressin, Tachykinin und Helicokinin I von ökonomisch relevanten Schadinsekten an artifiziellen Membranen durchgeführt. In diesem Abschnitt soll zuerst eine kurze Einführung in die verwendeten Methoden gegeben werden. Anschließend sind die Ergebnisse der natürlichen Neuropeptide dargestellt, gefolgt von Untersuchungen ausgewählter linearer Analoga.

2.1 Grundlagen der Konformationsanalyse von Peptiden mittels NMR

Die NMR-Spektroskopie besitzt in der Chemie eine besondere Bedeutung zur Strukturaufklärung sowohl organischer Moleküle als auch von Peptiden und größeren Proteinen. Im Jahre 1946 veröffentlichten Felix Bloch^[136] und Edward Mills Purcell^[137] unabhängig voneinander die ersten NMR-Experimente und wurden dafür 1952 mit dem Nobelpreis für Physik geehrt. Seitdem gab es eine Reihe fundamental wichtiger Fortschritte, von denen hier die Einführung der FT-Technik,^[138] die Etablierung mehrdimensionaler Experimente^[139-141] sowie moderne Bildgebungsverfahren^[142] genannt werden sollen. Besonders durch die Einführung der 2D-Techniken^[143,144] konnten enorme Fortschritte in der Interpretation der NMR-Spektren und der Extraktion der für Konformationsanalysen benötigten Parameter erreicht werden. Bei Konformationsanalysen werden Restriktionen innerhalb des Moleküls wie Bindungslängen und Bindungswinkel mit strukturelevanten, experimentell gewonnenen Einschränkungen wie interatomare Abstands- und Diederwinkel-Beschränkungen kombiniert.^[145]

Von besonderer Bedeutung sind Restriktionen interatomarer Wasserstoffabstände, die durch Ausnutzung des Kern-Overhauser-Effekts (NOE) erhalten werden. NOEs resultieren hierbei aus Kreuzrelaxation zwischen räumlich nahen Kernspins in einem Molekül, die nicht notwendigerweise skalar gekoppelt sind. Die Stärke des NOE ist dabei umgekehrt proportional zum Atomabstand in der sechsten Potenz. Dadurch können räumliche Wasserstoffatomabstände kleiner 5 Å ermittelt werden.

$$\text{Formel 1} \quad \text{NOE} \sim \frac{1}{r^6}$$

Für die Strukturrechnung ist die Quantifizierung der NOEs notwendig. Aufgrund der Abhängigkeit der Signalintensität von der individuellen Linienbreite ist diese dafür nur bedingt geeignet. Als vorteilhaft erweist sich hierbei die Integration über die Peakfläche. Auf Basis von Formel 1 werden die NOEs für Strukturrechnungen als obere Distanzlimits und nicht als prä-

zise Abstände behandelt, da die Stärke der NOEs durch interne Beweglichkeit der Protonen und chemischen Austausch abgeschwächt sein können.^[144] Daher wird auch das Fehlen eines NOE nicht als hoher Abstand zweier kuppelnder Spins gewertet. Für die Praxis liegen somit die erlaubten Abstandsbereiche zwischen der durch die NOEs ermittelten Obergrenze und der Summe der Van-der-Waals Radien zweier Wasserstoffatome als Untergrenze.

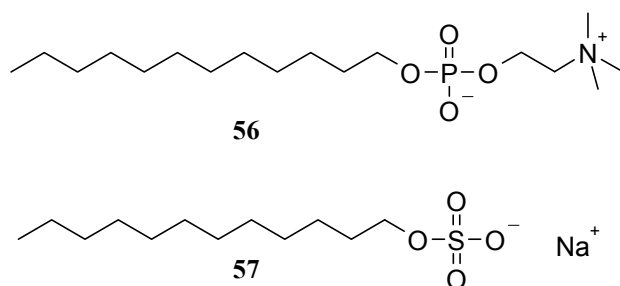
Vicinale Kopplungskonstanten gehören nach den NOEs zur zweiten wichtigen Informationsquelle für die Konformationsanalyse von Molekülen. Die Größe der 3J -Kopplungskonstanten, d.h. Kopplungen zwischen Atomen separiert durch drei Bindungen, ist hauptsächlich abhängig vom dihedralen Winkel der Atome zueinander und besitzt ein Maximum bei 0° und 180° . Diese Abhängigkeit wird durch die Karplus-Kurve wiedergegeben.^[146]

Aufgrund einer gewissen Flexibilität kleiner Peptide, besonders in den Seitenketten, erfolgt eine Mittelung der Kopplungskonstanten. Daher besitzen dihedrale Einschränkungen für die Konformationsanalyse kleiner Peptide im Gegensatz zur Analyse großer Proteine oder kleiner rigider cyclischer Verbindungen nur eine untergeordnete Rolle.

2.2 Durchführung der NMR-Messungen an artifiziellen Membranen

Bezüglich des Membran-Kompartiment Modells besitzen NMR-Konformationsuntersuchungen von Peptiden an artifiziellen Membranen eine höhere Relevanz verglichen mit den Messungen in Lösung. Als Detergenzien für künstliche Membranen finden SDS (**57**) und DPC (**56**) breite Anwendung, da beide in deuterierter Form kommerziell erhältlich sind (Tabelle 5).^[147,148] Andere Detergenzien wie β -D-Octylglucosid, β -D-Decylglucosid und CHAPSO sind nicht perdeutert erhältlich und benötigen somit $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierte Peptide und Proteine.^[149-151] Daher kommen diese nur begrenzt zur Anwendung. Die Aggregationsnummer, d.h. die durchschnittliche Anzahl an DPC-Molekülen in einer Mizelle, beträgt 56. Diese Mizellen besitzen einen Durchmesser von 39 \AA und liegen somit im relevanten Bereich biologischer Membranen die oftmals eine Dicke von 50 \AA haben.^[152,153] Die hydro-

Abb. 22: Strukturen von DPC (**56**) und SDS (**57**)



philen Neuropeptide werden in einer MES gepufferten Lösung (pH = 5.5) in 90% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ gemessen. Diese Messbedingungen werden gewählt, um möglichst physiologische Bedingungen zu erhalten und den Austausch der labilen Protonen durch Deuterium zu unterbinden.

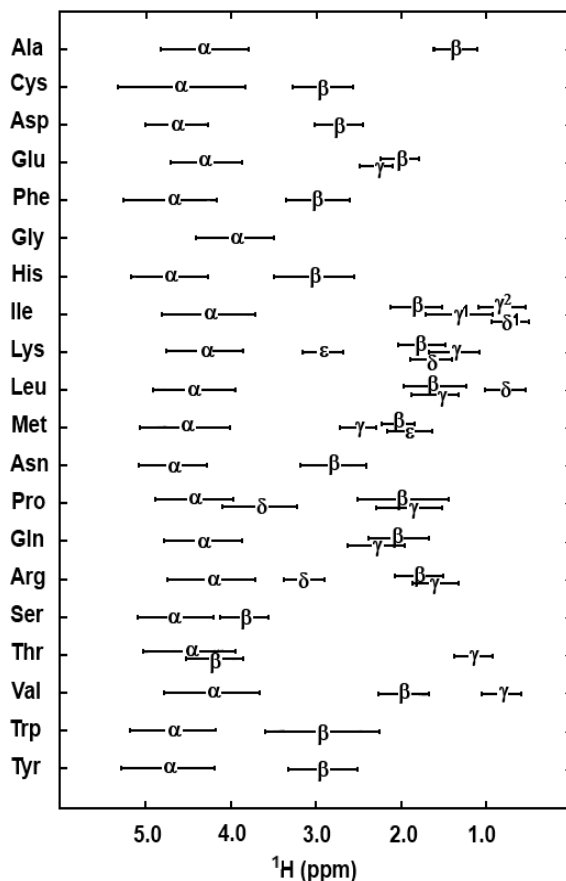
Tabelle 5: CMC und Aggregationsnummer für SDS^[149,150,154] und DPC-Mizellen.^[155]

Detergens	CMC [mM]		Aggregationsnummer	
	0-0.05 M Na ⁺	0.1-0.2 M Na ⁺	0-0.1 M Na ⁺	0.1-0.2 M Na ⁺
SDS	3-10	0.9-2	60-75	100-150
DPC	1.1		56	

2.3 Messung und Auswertung der NOESY-Spektren

Für eine erfolgreiche Konformationsrechnung ist die Zuordnung der Resonanzfrequenz aller Signale eine Grundvoraussetzung. Basierend auf der von Wüthrich entwickelten Prozedur zur sequenzspezifischen Zuordnung wurde unter Verwendung des Programmes XEASY die Spektreninterpretation sowie die Signalintegration durchgeführt.^[139,156] Für die kurzen Neuro-peptide kann die zweifelsfreie sequenzspezifische Zuordnung der chemischen Verschiebungen aufgrund der NOESY-Spektren erfolgen, jedoch wurde wenn nötig zusätzlich auf COSY- und TOCSY-Spektren zurückgegriffen. Ausgangspunkt für die Resonanzzuordnung ist die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren. Als hilfreich erweisen sich hierbei markante

Abb. 23: Typische chemische Verschiebungen der aliphatischen Protonen der Aminosäuren



Spinmuster, chemische Verschiebungen sowie die Länge der Spinsysteme.^[157]

Auch die besonders tieffeldverschobenen β -Protonen von Serin und Threonin sind für die Identifizierung der Aminosäuren überaus hilfreich. Oftmals ist eine direkte eindeutige Zuordnung alle Spinsysteme nicht möglich. Nach sequenzieller Verknüpfung von zwei, drei oder vier Aminosäuren ist die Zuordnung jedoch auch in größeren Peptiden meist eindeutig. Für die sequenzielle Zuordnung der Aminosäure-Spinsysteme stellt das NOESY ein Schlüsselexperiment dar, da zwei AS-Reste immer zu verschiedenen Spin-systemen gehören. Für den „sequential walk“, also die sequenzielle Verknüpfung der Aminosäuren, benutzt man besonders die kurzen sequenziellen $H\alpha_i-NH_{i+1}$ Abstände, da diese

neben den intraresiduellen $\text{NH}_i\text{-H}\alpha_i$ in der Fingerprint-Region der Aminosäuresequenz liegen, das heißt in einem Bereich des Spektrums in dem außer den $\text{NH-H}\alpha$ -Peaks keine weiteren Signale zu erwarten sind. Die sequenzspezifische Verknüpfung der Aminosäuren ist in Abb. 24 schematisch am Beispiel des Tachykinins (**4**) vom *N*- zum *C*-terminalen Ende gezeigt.

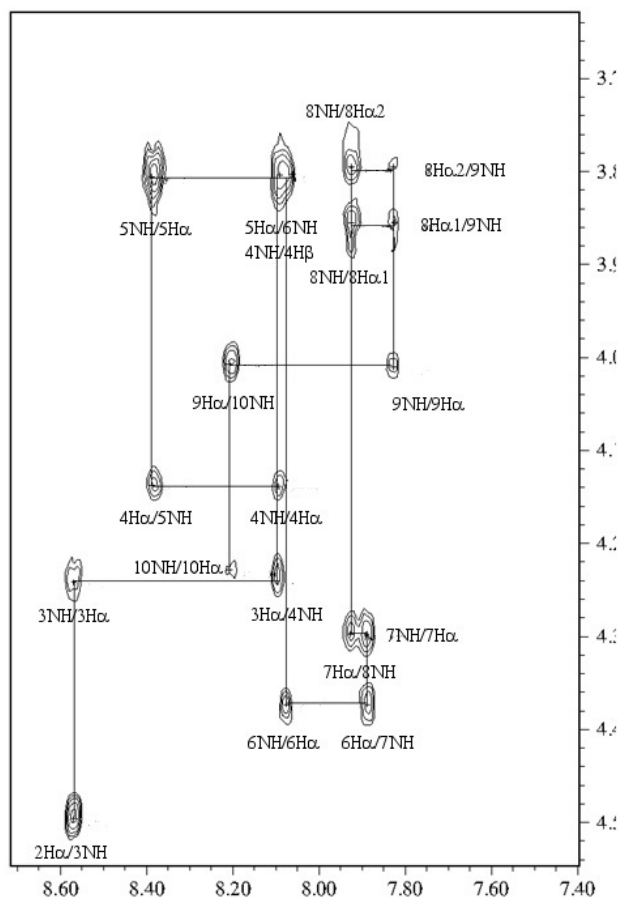
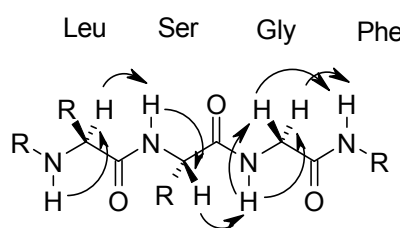


Abb. 24: Darstellung des „sequential walk“ an einem Ausschnitt des Tachykinins (**4**): schematische Darstellung zwischen Leu^3 und Phe^6 (unten); praktische Durchführung im NOESY-Spektrum (links)



Basierend auf den nun erhaltenen Resonanzfrequenzen ist eine Zuordnung aller eindeutigen NOEs empfehlenswert. Die Zuordnung mehrdeutiger NOEs erfolgt in einem iterativen Prozess, in dem vorläufige, aus den eindeutigen NOEs erhaltene dreidimensionale Strukturen zum Einsatz kommen.^[158] Für die Durchführung der Strukturrechnungen ist eine Quantifizierung der NOEs notwendig, da jedoch die Linienbreiten verschiedener Signale beachtlich variieren können, werden anstatt der Peakhöhen die Peakvolumina verwendet.

2.4 Konformationsberechnungen mit dem Programm CYANA

Im Zuge dieser Arbeit wurde für die Konformationsuntersuchungen das Programm CYANA^[159,160] verwendet, das sich vielfach für die NMR-unterstützte Strukturbestimmung von Peptiden und Proteinen bewährt hat.^[61,77,85,161,162] Der in CYANA implementierte Algo-

rithmus benutzt ein *Simulated-Annealing*-Protokoll kombiniert mit Molekulardynamik-Simulationen unter Verwendung von Torsionswinkeln als generalisierte Koordinaten.

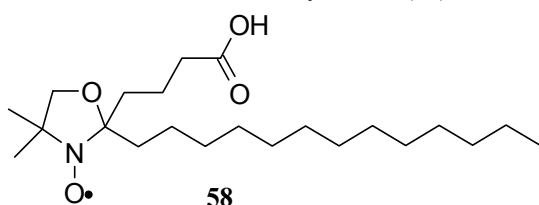
Auf der Suche nach dem globalen Minimum übernimmt die Zielfunktion hierbei die Rolle der potenziellen Energie des Systems und ist an ein „Temperaturbad“ gekoppelt, das langsam von einer hohen Temperatur abgekühlt wird. Dadurch können Energiebarrieren zwischen lokalen Minima übersprungen werden. Durch die Verwendung von Torsionswinkeln als Koordinaten werden kovalente Strukturparameter wie Bindungslängen, Bindungswinkel, Planarität und Chiralität auf ihren optimalen Wert festgelegt, was verglichen mit Moleküldynamikrechnungen im kartesischen Raum in einer deutlich einfacheren Zielfunktion und damit einem effizienteren Algorithmus resultiert. CYANA behandelt das Peptid als Baumstruktur bestehend aus $n+1$ starren Körpern, die über n drehbare Bindungen miteinander verknüpft sind. Jeder der starren Körper besteht aus einem oder mehreren Massepunkten (Atome), deren Positionen zueinander nicht variabel sind. Durch die Werte aller Torsionswinkel φ , ψ und χ_1 - χ_x ist die Konformation der Peptidkette eindeutig festgelegt (ω ist aufgrund der Amidresonanz auf 180° bzw. 0° festgelegt). Die verwendete Zielfunktion, das heißt die potenzielle Energie des Systems, wird als 0 definiert, wenn alle experimentellen Distanz-*Restrains* und Torsionswinkel-*Restrains* unverletzt sind und ungebundene Atompaaire untereinander keine sterische Überlappung aufweisen. Für die mathematischen Hintergründe des in CYANA implementierten Algorithmus sei an dieser Stelle auf die Originalliteratur verwiesen.^[159] Als Input für eine Strukturrechnung benötigt CYANA die Sequenz des Peptids sowie die mit XEASY integrierten NOEs als Distanz-Beschränkungen. Die ermittelten Distanz-Beschränkungen werden als obere Distanzlimits verwendet, anstatt als präzise Abstände, da interne Bewegung und chemischer Austausch zur partiellen Verminderung der Stärke der NOEs führen kann.^[139,144]

2.5 Spin-Label Experimente

Zusätzlich zu den NMR-gestützten Konformationsbestimmungen von Peptiden an artifiziellen Membranen lassen sich mit Hilfe von Spin-Label Experimenten Aussagen über die Orientierung des Peptids an der Membranoberfläche treffen. Spin-Label beinhalten ungepaarte Elektronen, die durch effiziente dipolare Elektronen-Kern-Spin Kopplung zu einer beschleunigten

transversalen und longitudinalen Relaxation führen. Die gebräuchlichsten und auch kommerziell erhältlichen Spin-Label sind 5-, 7- und 12- Doxyl-substituierte Stearate, wobei in dieser Arbeit 5-Doxylstearat (**58**) verwendet wurde, das auch in der Literatur am meisten

Abb. 25: Struktur von 5-Doxylstearat (**58**)



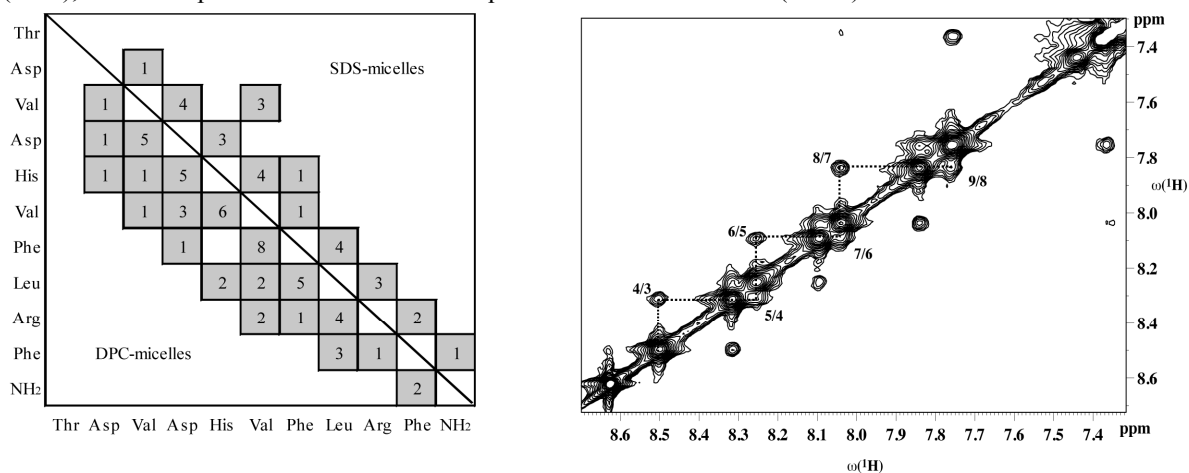
Anwendung findet.^[145] Protonen die sich in der näheren Umgebung zum Membran-integrierten Spin-Label befinden, zeigen eine deutliche Abnahme der Signalintensität, wohingegen entferntere Signale weniger beeinflusst werden. Um ein umfassendes Bild der Membranbindung zu erhalten wurde sowohl auf die Abschwächung der Signalintensität der NH-H α -Kreuzpeaks als auch auf Signale der Protonen der Seitenketten zurückgegriffen.

2.6 NMR-Untersuchungen der Insekten-Neuropeptiden

2.6.1 Myosuppressin

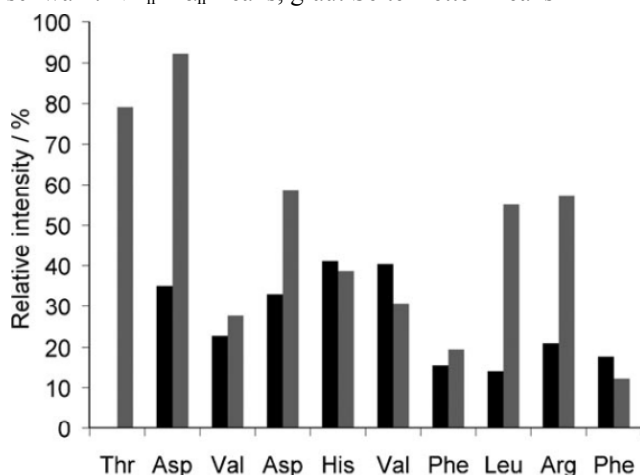
Die nicht austauschbaren Protonen des Myosuppressins (**3**) konnten sowohl in SDS-Mizellen als auch in DPC-Mizellen zugeordnet werden. Ausnahmen bildeten hierbei die ϵ - und ζ -Protonen der Phenylalanine Phe⁶ und Phe¹⁰ sowie das ϵ 1 des Histidins His⁵. Aufgrund starker sequenzieller NH_n-NH_{n+1} Kreuzpeak wurde schnell ersichtlich, dass Myosuppressin eine helikale Struktur in DPC-Mizellen bildet. Es wurde eine hohe Anzahl interresidueller NOEs gefunden, hauptsächlich sequenzielle jedoch auch mehrere medium-range NOEs. Dadurch war eine ausreichende Anzahl oberer Distanzlimits für die Strukturrechnung vorhanden. Wie erwartet wurde für das Myosuppressin eine rechtshändige helikale Struktur mittels restrained MD-Simulation berechnet. Der *N*-Terminus ist flexibel, jedoch zeigt sich eine gut definierte Helix zwischen den Aminosäuren Val³ und Arg⁹.

Abb. 26: Anzahl der signifikanten interresiduellen NOEs von Myosuppressin in SDS- und DPC-Mizellen (links), NOESY-Spektrum im Bereich der sequentiellen Amid-Protonen (rechts)



Die im Vergleich zu den intraresiduellen Kreuzpeaks stärkeren sequenziellen H α -HN Signale weisen auf ein Gleichgewicht zwischen membrangebundenem, helikalen und ungebundenem, unstrukturierten Myosuppressin hin. Distanzverletzungen zwischen den α - und β -Protonen des Leu⁸ und einer Methylgruppe des Val⁶ basieren ebenfalls auf der Mischung von Konformeren. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass im Gegensatz zur Konformation in DPC-Mizellen nur eine limitierte Anzahl der interresiduellen, besonders der medium-range NOEs

Abb. 27: Relative Intensitäten der Myosuppressin Kreuz-peaks in Gegenwart von 5-Doxylstearat verglichen mit einem NOESY-Referenzspektrum ohne Spin-Label, schwarz: $\text{NH}_n\text{-H}\alpha_n$ -Peaks, grau: Seitenketten-Peaks

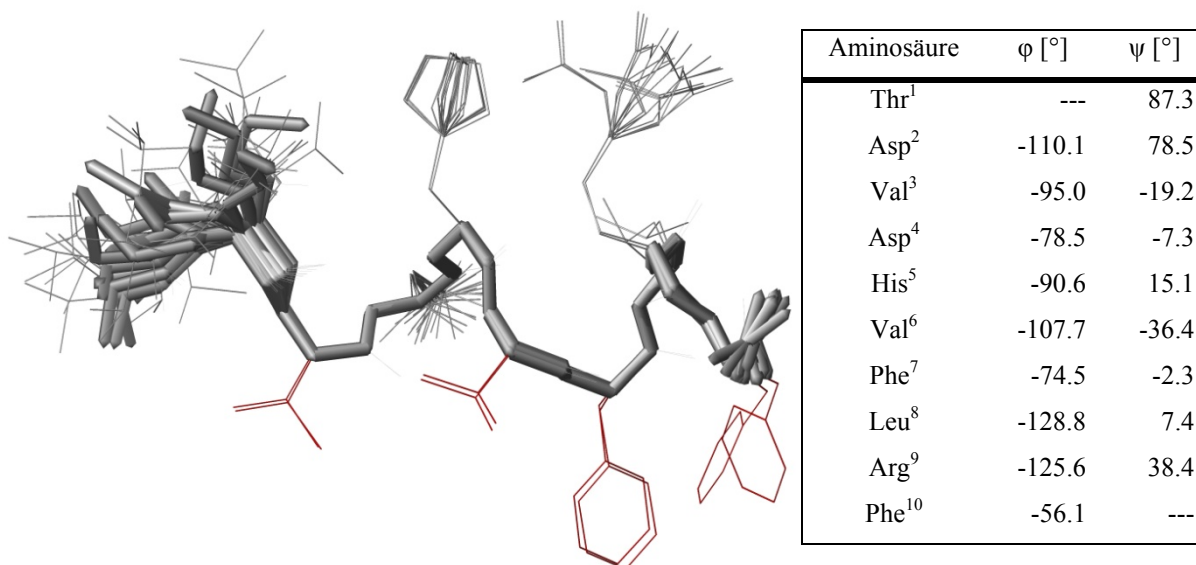


in SDS-Mizellen vorhanden war. Dies ist ein Beleg für das Vorliegen einer größtenteils unstrukturierten Konformation des Myosuppressins in SDS-Mizellen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Spin-Label Experimente zeigen eine starke Beeinflussung der Signal-Intensitäten der C-terminalen Aminosäuren Phe⁷ bis Phe¹⁰. Die Peptid-rückgrat-Protonen sind in diesem Bereich generell stark abgeschwächt. Von

den Seitenketten werden besonders die beiden Phenylalanine stark beeinflusst. Am N-Terminus zeigt nur Val³ eine deutliche Reduktion der Intensität. Die ermittelten Daten lassen auf eine hauptsächliche Verankerung des Myosuppressins über die aromatischen Aminosäuren Phe¹⁰ und Phe⁷ sowie der hydrophoben Aminosäuren Val⁶ und Val³ schließen. Die starke Membranbindung der Phenylalanine steht im Einklang mit Untersuchungen von White und Wimley, die eine starke energetische Bevorzugung der Membranbindung aromatischer Aminosäuren beobachteten.^[70]

Abb. 28: Konformation von mizellgebundenem Myosuppressin (**3**) sowie dessen berechnete Torsionswinkel φ und ψ in DPC-Mizellen

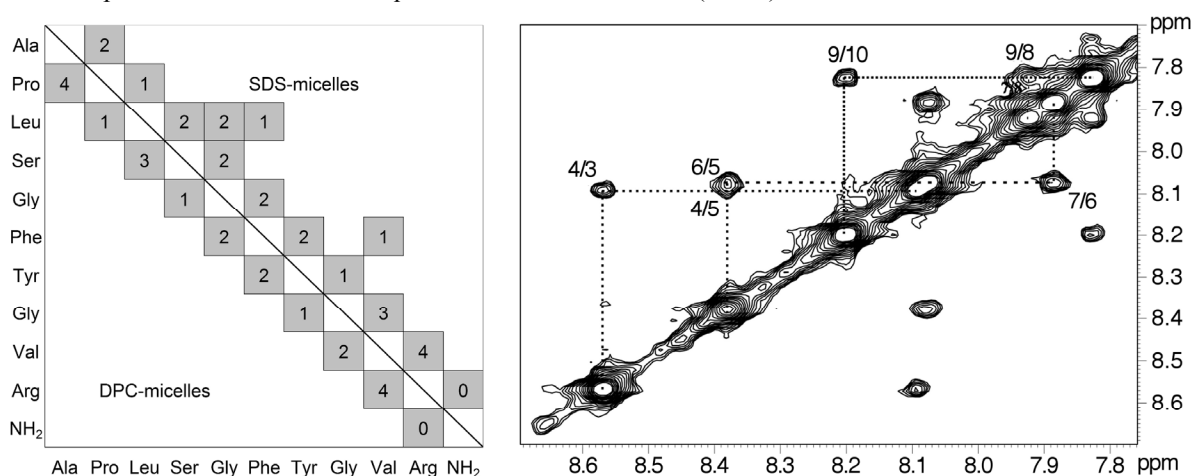


Die Daten der Membranbindung stehen im Einklang mit der ermittelten α -helikalen Struktur, bei der sich alle hydrophoben Aminosäuren auf einer Seite der Helix befinden, wohingegen hydrophile Seitenketten zur anderen Seite der Helix gerichtet sind. Die Bedeutung der Membranbindung zur Stabilisation sekundärer Strukturelemente wird durch die Nichtstrukturierung des Myosuppressins in Abwesenheit von Mizellen unterstützt.

2.6.2 Tachykinin

Alle nicht austauschbaren Protonen des Tachykinins (**4**) konnten sowohl in DPC als auch in SDS-Mizellen zugeordnet werden. Relativ starke $\text{NH}_n\text{-NH}_{n+1}$ Peaks lassen analog zum Myosuppressin eine helikale Konformation vermuten. Wie man Abb. 29 entnehmen kann, konnten sowohl in SDS- als auch in DPC-Mizellen nur eine geringe Anzahl interresidueller Kreuzpeaks gefunden werden. In DPC-Mizellen waren die interresiduellen Kreuzpeaks ausschließlich sequenzieller Natur, in SDS-Mizellen dagegen waren zusätzlich wenige medium-range NOEs vorhanden. Für eine erfolgreiche Strukturrechnung war jedoch die Anzahl der oberen Distanzlimits zu gering. Das Fehlen von aussagekräftigen NOEs kann als geringere Affinität des Tachykinins zur Membran oder, weniger wahrscheinlich, als höhere Flexibilität des membrangebundenen Tachykinins interpretiert werden. Spin-Label Untersuchungen lieferten keine zusätzlichen Erkenntnisse, wodurch die These der geringen Affinität zur Membran unterstützt wird. Das Vorhandensein sequenzieller Amid-Kontakte weist dennoch auf eine überwiegende Population von Torsionswinkeln hin, die zu einer helikalen Struktur passen. Das Fehlen von medium-range Kontakten ist durch eine schnelle Umwandlung zu weniger gefalteten Konformationen erklärbar.

Abb. 29: Anzahl der signifikanten interresiduellen NOEs von Tachykinin (**4**) in SDS- und DPC-Mizellen(links), NOESY-Spektrum im Bereich der sequenziellen Amid- Protonen (rechts)



2.6.3 Helicokinin I

Für das Helicokinin I konnten alle nichtaustauschbaren Protonen außer den ϵ - und ζ -Signalen sowie dem C-terminalen Amid sowohl in SDS- als auch in DPC-Mizellen eindeutig zugeordnet werden. In beiden Systemen wurden sequenzielle und medium-range Kontakte beobachtet, besonders zahlreich zwischen Pro⁴ und Trp⁵, jedoch auch zwischen Trp⁵ und Ser³, sowie Phe² und Pro⁴. Strukturrechnungen ergeben analoge Konformationen in SDS- und DPC-Mizellen. Stetige Distanzverletzungen nach der Strukturrechnung können auf verschiedene Orientierungen des π -Systems des Tryptophans zurückgeführt werden. Deshalb wurden die NOEs in zwei verschiedene Datensätze eingeteilt. Dadurch ergaben sich zwei unterschiedliche Konformationen der Indol-Seitenkette. Unabhängig von den Detergenzien (SDS, DPC) und von den Datensätzen wurde in den Strukturrechnungen ein I β -Turn erhalten, gebildet durch die Aminosäuren Ser³ (i), Pro⁴ (i+1), Trp⁵ (i+2) und Gly⁶ (i+3). Der N-Terminus scheint größtenteils unstrukturiert zu sein. In Abwesenheit von Mizellen wurde nur eine begrenzte Anzahl an interresiduellen NOEs (ROESY) beobachtet. Damit ist eine Vorzugskonformation in wässriger Lösung ausgeschlossen. Dies belegt deutlich, dass die Bildung des β -Turns durch die Wechselwirkung des Peptids mit der Membran induziert wird.

Abb. 30: Bevorzugte Konformation von Helicokinin I (5) in Gegenwart von DPC-Mizellen

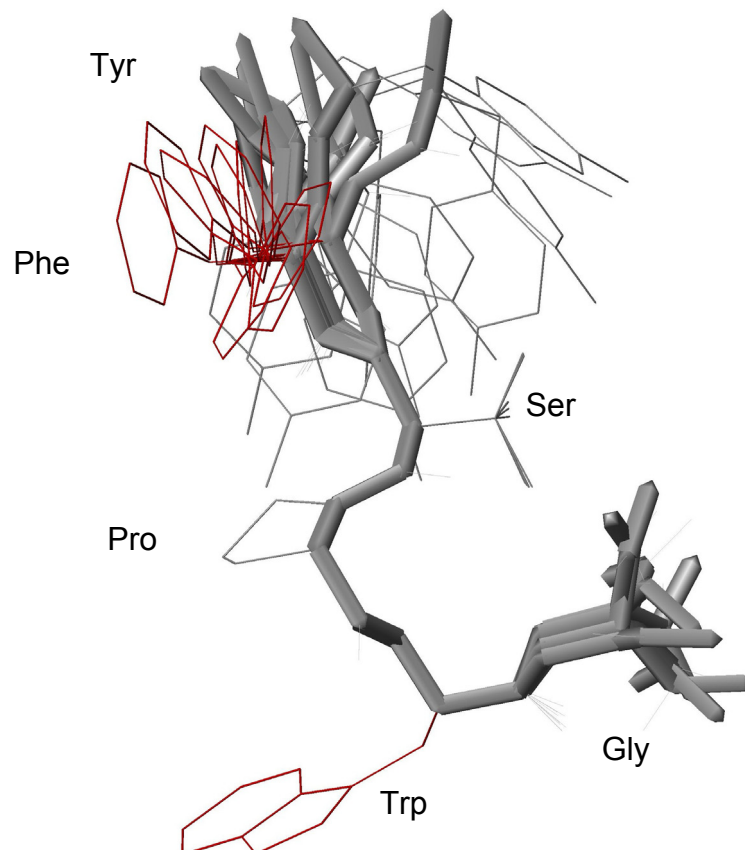
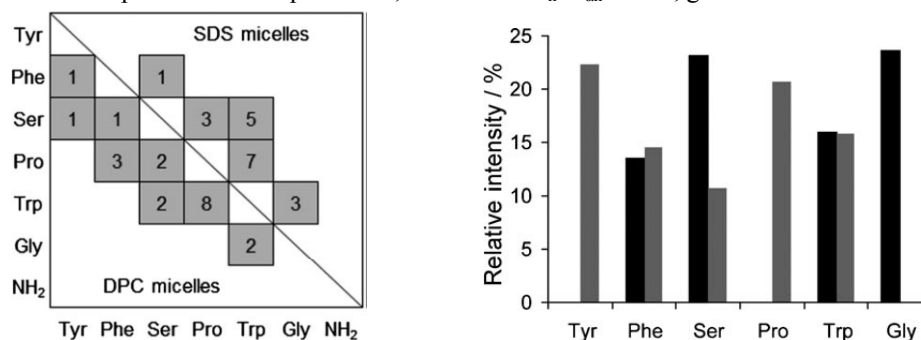


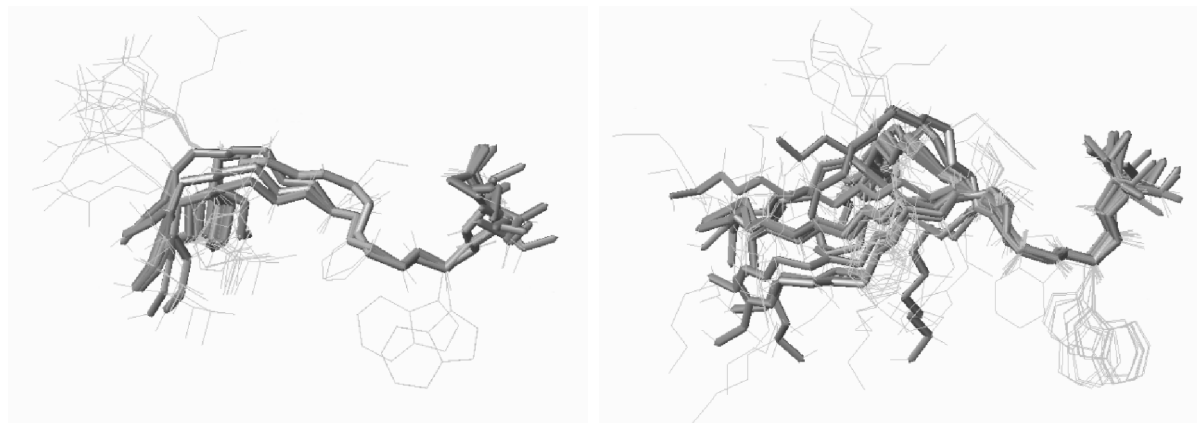
Abb. 31: Anzahl der signifikanten interresiduellen NOEs von Helicokinin I (**5**) in SDS- und DPC-Mizellen (links); relative Intensitäten der Helicokinin I Kreuzpeaks in Gegenwart von 5-Doxylstearat verglichen mit einem NOESY-Referenzspektrum ohne Spin-Label; schwarz: $\text{NH}_n\text{-H}_{\text{am}}$ -Peaks, grau: Seitenketten-Peaks (rechts)



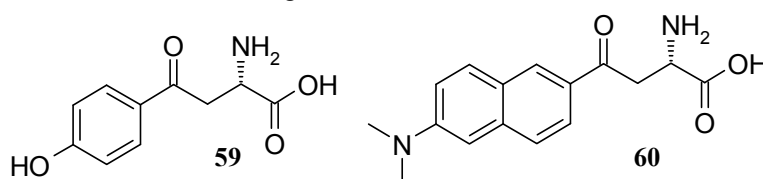
Die Spin-Label Experimente zeigten eine erhebliche Abschwächung der Intensitäten, sowohl der Rückgrat $\text{NH-H}\alpha$ -Signale als auch der Seitenketten-Peaks. Dies belegt eine starke Membranbindung des Helicokinin I. Die stärkste Reduktion der Signal-Intensität wurde für die aromatischen Aminosäuren Phe² und Trp⁵ beobachtet, wogegen die Beeinflussung des Glycins geringer ausfällt. Die Beeinflussung der Seitenkette zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die Rückgrat-Signale. Phenylalanin und Tryptophan werden am stärksten beeinflusst, Prolin und Tyrosin nur in geringerem Umfang.

Das plausibelste Modell für die Membranbindung legt eine Verankerung des Helicokinin I durch Trp⁵ des rigiden β -Turns und Phe² am flexiblen *N*-Terminus nahe. Bemerkenswerterweise sind genau diese beiden Aminosäuren für die biologische Aktivität am Rezeptor absolut unverzichtbar. Viele biophysikalische Studien belegen die Relevanz von Tryptophan zur Verankerung von Peptiden an der Membran/Wasser-Grenzfläche.^[163]

Die Helicokinine II (**6**) und III (**7**) erweisen sich als deutlich flexibler als das Helicokinin I (**5**). Die Konformationen beider Peptide zeigen eine starke Abhängigkeit von dem verwendeten Detergens. Helicokinin II zeigt vielfältige Konformationen in DPC-Mizellen. Dagegen überwiegt in SDS-Mizellen eine β -Turn-Struktur, wobei analog zum Helicokinin I der *N*-Terminus eine hohe Flexibilität aufweist. Helicokinin III ist deutlich weniger strukturiert und zeigte nur wenige medium-range Kontakte. In DPC-Mizellen liegt es als Gemisch aus gestreckten und Turn-artigen Konformationen vor. In SDS-Mizellen hingegen überwiegt ein C-terminaler β -Turn.

Abb. 32: Bevorzugte Konformationen des Helicokinin II (links) und Helicokinin III (rechts) in SDS-Mizellen

Arbeiten von H. Chen unterstützen das für Helicokinin I erarbeitete Modell der Membranbindung.^[134] Grundlage für diese Arbeiten ist die Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von der Polarität der Umgebung auf molekularer Ebene.^[164,165] Da Neuropeptide sehr empfindlich gegenüber strukturellen Modifikationen sind, ist bei einer Linker-verbrückten Anknüpfung eines Fluoreszenzmarkers der komplette Verlust der biologischen Aktivität zu erwarten. Vielversprechender ist der Ersatz einzelner Aminosäuren durch strukturell verwandte fluoreszierende Aminosäure-Analoga.^[166] Von H. Chen wurden das fluoreszierende Tyrosin-Analogon Alb **59** und Tryptophan-Analogon **60** in das Helicokinin I eingebaut.^[133,167] Fluoreszenzmessungen der Peptide [Alb¹]-Helicokinin I (**46**) und [Ald⁵]-Helicokinin I (**61**) in unterschiedlichen Lösungsmitteln bestätigen die Abhängigkeit der Emissionswellenlänge von der Umgebungspolarität (Tabelle 6).

Abb. 33: Fluoreszierende Aminosäure-Analoga Alb **59** und Ald **60**

Messungen des [Ald⁵]-Helicokinin I in DPC-Mizellen zeigen eine erhebliche Blauverschiebung des Emissionsmaximums um 43 nm. Verglichen mit den reinen Lösungsmitteln entspricht dies der Blauverschiebung in Octanol, das ebenfalls häufig als Modell-Membran Verwendung findet und belegt die Bindung des [Ald⁵]-Helicokinin I an die DPC-Mizellen mit der fluorophoren Seitenkette. [Alb¹]-Helicokinin I zeigt in DPC-Mizellen keine Verschiebung des Emissionsmaximums verglichen mit Wasser oder Hepes-Puffer. Für eine Bindung der Alb-Seitenkette an die Membran wäre eine Blauverschiebung auf etwa 300 nm, also dem Bereich des Octanols zu erwarten. Die Alb-Seitenkette liegt daher in einer wässrigen Umgebung vor

und zeigt keine Bindung an die Mizellen. Beide Ergebnisse stehen im guten Einklang mit den Ergebnissen der Spin-Label-Untersuchungen. Auch hier wurde gefunden, dass Tryptophan eine für die Membranbindung essenzielle Aminosäure darstellt, die Tyrosin-Seitenkette dagegen zur Membran abgewandten Seite gerichtet ist.

Tabelle 6: Emissionsmaxima von [Alb¹]-Helicokinin I (**46**) und [Ald⁵]-Helicokinin I (**61**) in Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante ϵ des Lösungsmittels (Peptid-Konzentration $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l).

Lösungsmittel	ϵ	[Alb ¹]-Helicokinin I	[Ald ⁵]-Helicokinin I
		$\lambda_{em}[nm]^a$	$\lambda_{em}[nm]^b$
Toluol	2.38	295	457
Ethylacetat	6.02	344	463
1-Octanol	17.5	299	482
Methanol	32.7	346	506
DMF	36.7	339	472
DMSO	46.7	349	475
H ₂ O	80.2	358	532

a) $\lambda_{ex} = 280$ nm (Toluol = 240 nm) b) $\lambda_{ex} = 350$ nm

Der an artifiziiellen Membranen gefundene 2-5 I β -Turn (gezählt über die Kernsequenz) widerspricht dem von Nachman postulierten 1-4 VI β -Turn^[88] und entspricht eher dem ebenfalls bei Kininen in Molekular-Dynamik-Simulationen erhaltenen 2-5 β -Turn.^[89] Die gefundene, membrangebundene Konformation des Helicokinin I besitzt eindeutig eine *trans*-Konfiguration an der X_{aa}-Pro Bindung, ohne dass signifikante Mengen eines *cis*-Isomers gefunden wurden. Eine Isomerisierung in das *cis*-Isomer vor oder während der Rezeptorbindung kann jedoch auch nach diesem Modell nicht ausgeschlossen werden. Unterstützt wird das auf der Membranbindung basierende Bindungsmodell durch aktuelle Ergebnisse der Forschung an dem humanen Neuropeptid Bradykinin.^[61] Dieses bindet ebenfalls an einen Rhodopsin-ähnlichen GPCR und zeigt eine signifikante Sequenzhomologität zum Helicokinin I. So teilen beide Peptide die Aminosäuren Phe, Ser, Pro und das N-termiale Amid. In Position 2 (vom C-Terminus gezählt) besitzen beide Peptide eine lipophile Aminosäure. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich in der C-terminalen Aminosäure, die in beiden Peptiden als

Abb. 34: Fluoreszenzemissionsspektren von [Ald⁵]-Helicokinin in DPC-Mizellen, $\lambda_{ex} = 350$ nm, Peptid-Konzentration = $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

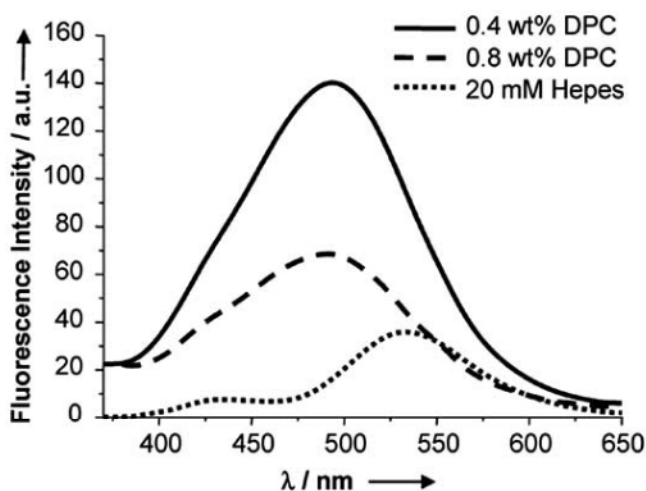


Abb. 35: Sequenzvergleich der Peptide Helicokinin I und Bradykinin (**62**)

Bradykinin: Arg-Pro-Pro-Gly-**Phe-Ser-Pro**-Phe-Arg-NH₂

Helicokinin I: Tyr-**Phe-Ser-Pro**-Trp-Gly-NH₂

relevant für die Rezeptorbindung gilt. Die Peptid-rückgrat-Struktur des Bradykinins konnte kürzlich

im Rezeptor-gebundenen Zustand und an DDM-Mizellen bestimmt werden. Im Rezeptor-gebundenen Zustand bildet das Bradykinin einen I β -Turn bestehend aus den C-terminalen Aminosäuren Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹ und einen flexibleren α -helikalen Bereich am N-Terminus. Die Prolin-Reste liegen alle in ihrer *trans*-Konfiguration vor. Die Torsionswinkel belegen einen dem membrangebundenen Helicokinin I analogen I β -Turn. In DDM-Mizellen zeigt das Bradykinin eine Änderung des Turn-Subtyps, die grundlegende Turn-Struktur bleibt jedoch erhalten (Tabelle 7). Analog zum Helicokinin I ist das Bradykinin (**62**) in wässriger Lösung größtenteils flexibel. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse auf eine mögliche biologische Relevanz des an DPC- und SDS-Mizellen gefundenen I β -Turns für die Rezeptorbindung schließen.

Tabelle 7: Vergleich der Torsionswinkel des membrangebundenen Helicokinin I und des Bradykinins

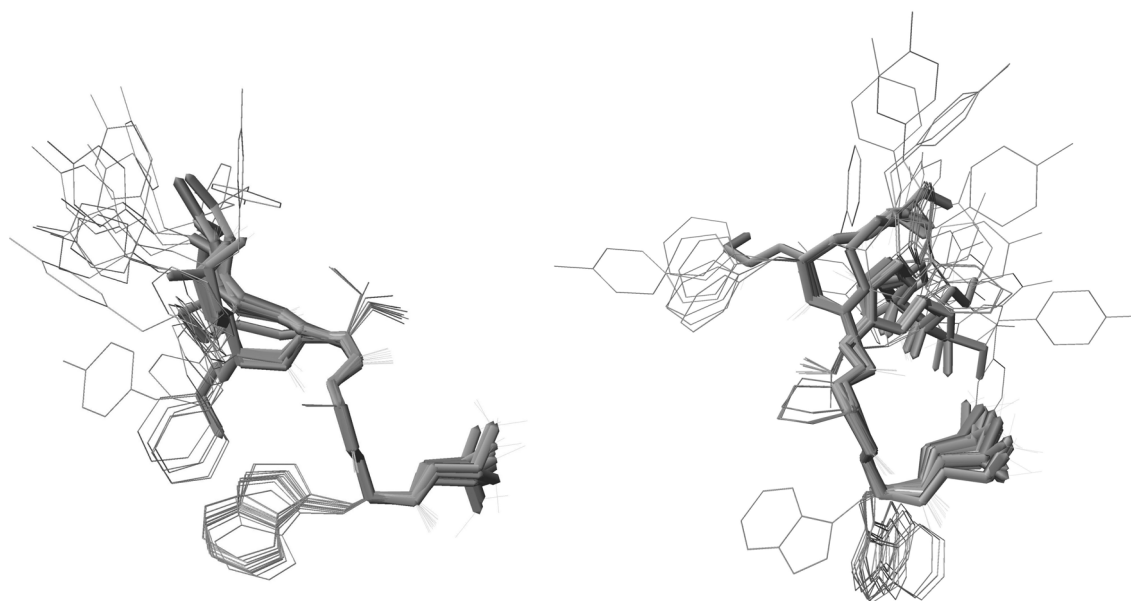
idealer Turn	I β -	Helicokinin I (DPC)				Bradykinin			
				am Rezeptor		in DDM			
		Φ (Phi) [°]	Ψ (Psi) [°]	Φ (Phi) [°]	Ψ (Psi) [°]	Φ (Phi) [°]	Ψ (Psi) [°]		
				Arg ¹	88			95	
				Pro ²	-75	-33	-75	-34	
				Pro ³	-75	-6	-75	-18	
	Tyr ¹		108	Gly ⁴	-64	-15	78	2	
	Phe ²	-131	134	Phe ⁵	-68	150	-63	132	
	Ser ³	-127	100	Ser ⁶	-121	-165	-88	150	
$\Phi_{(i+1)}$ -60	$\Psi_{(i+1)}$ -30	Pro ⁴	-75	-11	Pro ⁷	-75	-11	-75	149
$\Phi_{(i+2)}$ -90	$\Psi_{(i+2)}$ 0	Trp ⁵	-105	-18	Phe ⁸	-76	-16	-110	-39
		Gly ⁶	-149		Arg ⁹	49		41	

2.7 Konformationsuntersuchungen ausgewählter linearer Helicokinin I-Derivate

Im Rahmen der Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen wurden zahlreiche Helicokinin I-Analoga synthetisiert und auf ihre biologische Wirkung untersucht. Für einige ausgewählte Analoga wurden detaillierte Konformationsanalysen an DPC- und SDS-Mizellen durchgeführt, mit dem Ziel potenzielle Zusammenhänge zwischen der biologischen Aktivität und der Vorzugskonformation zu erkennen. Aus den Alanin-Scans wurden das vollständig biologisch aktive [Ala⁴]-Helicokinin I (**29**) sowie das unwirksame [Ala²]-Helicokinin I (**31**) gewählt. Durch den Austausch des Phenylalanins gegen Alanin im Peptid **31** ist eine signifikant verrin-

gerte Membranaffinität zu erwarten. Dies sollte sich durch eine geringere Membran-induzierte Stabilisierung des β -Turns und einer größeren Flexibilität des Moleküls zeigen. Tatsächlich liegt das Alanin-Analogon **31** in DPC-Mizellen als Gemisch mehrerer Konformere vor. Durch die hohe Signalüberlappung ist von diesem Peptid eine Konformationsanalyse nicht möglich. Der Austausch des Prolin gegen Alanin im Derivat [Ala⁴]-Helicokinin I (**29**) sollte hingegen keine signifikante Änderung der Membranaffinität hervorrufen. Tatsächlich wird in den NMR-Spektren nur ein Konformer beobachtet. Die Anzahl sequenzieller und medium-range Kontakte ist vergleichbar mit denen des natürlichen Helicokinins. Die Strukturberechnung liefert zwei Lösungen, eine dem Helicokinin I analoge β -Turn-artige Struktur ($\varphi_{n+1} = -98^\circ$) und eine U-förmige Struktur ($\varphi_{n+1} = 65^\circ$). Letztere kann vom Helicokinin I aufgrund des für Prolin fixierten Winkel φ nicht eingenommen werden. Die beiden D-Aminosäureanaloge [D-Phe²]-Helicokinin (**36**) und [D-Pro⁴]-Helicokinin I (**34**) erwiesen sich im Rezeptor-Screening um 1000fach bzw. 600fach weniger aktiv. Aufgrund der Relevanz der Stereochemie sowohl des Phenylalanins als auch des Prolins ist eine Bestimmung des Einflusses der Chiralität auf die Membranbindung von Interesse. Das D-Phe-Analogon **36** zeigt sowohl in DPC als auch SDS-Mizellen zwei Signalsätze (70:30), verursacht durch die *cis/trans*-Isomerie am Prolin mit der *trans*-Verknüpfung als Hauptisomer. In SDS werden strukturgebende NOEs nur in unzureichender Anzahl gefunden, wohingegen die Anzahl interresidueller NOEs in DPC vergleichbar mit denen des unmodifizierten Helicokinin I sind. Strukturrechnungen ergeben sowohl in SDS- als auch DPC-Mizellen dem Helicokinin I analoge Konformationen, bestehend

Abb. 36: Konformation von [Ala⁴]-Helicokinin I (**29**) (links, $\varphi_{\text{Pro}} = -98^\circ$) und [D-Phe²]-Helicokinin I (**36**) (rechts) in Gegenwart von DPC-Mizellen



aus einem flexiblen *N*-Terminus und einem starren *C*-terminalen β -Turn. Angemerkt werden sollte, dass Phenylalanin Bestandteil des flexiblen *N*-Terminus ist, der *C*-Terminus jedoch in Sequenz und Struktur erhalten bleibt. Daher kann die dramatische Reduktion der Rezeptoraktivität nicht auf konformative Änderungen zurückgeführt werden (Tabelle 8). Das Ergebnis deutet vielmehr auf eine Beteiligung der *N*-terminalen Aminosäuren bei der Rezeptorbindung hin. Die NOESY-Spektren des [D-Pro⁴]-Analogons **34** zeigen ausschließlich sequenzielle Kontakte als Hinweis auf eine unstrukturierte Konformation. Unzweifelhaft ist durch die *D*-Konfiguration des Prolins die Bildung eines dem Helicokinin I (**5**) analogen 1β -Turn nicht mehr möglich. Dadurch wird die Bindung an den Helicokinin-Rezeptor verhindert.

Tabelle 8: Torsionswinkel des Helicokinin I und der [Ala⁴]- und [D-Phe²]-Analoga

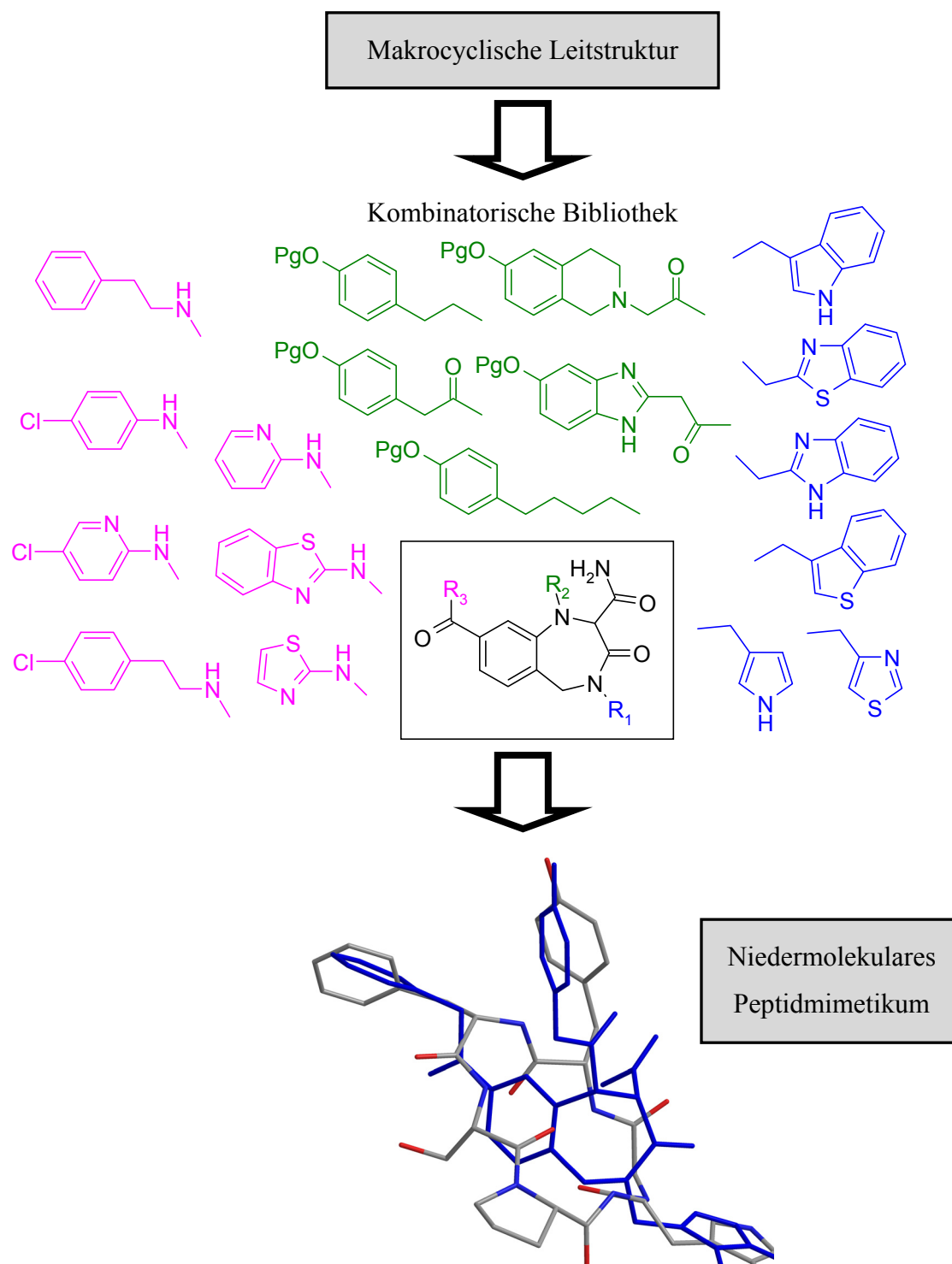
1 β -Turn Position	Helicokinin I		[Ala ⁴]-Helicokinin I (29)			[D-Phe ²]-Helicokinin I (36)	
	ϕ [°]	ψ [°]	ϕ [°]	ψ [°]	ϕ [°]	ψ [°]	
	Tyr ¹	108	Tyr ¹	-54	Tyr ¹	91	
	Phe ²	-131	Phe ²	-93	D-Phe ²	57	
i	Ser ³	-127	Ser ³	-145	Ser ³	66	
i+1	Pro ⁴	-75	Ala ⁴	-98, 65	Pro ⁴	-75	
i+2	Trp ⁵	-105	Trp ⁵	-96	Trp ⁵	-66	
i+3	Gly ⁶	-149	Gly ⁶	-175	Gly ⁶	-170	

3. „Conformational Design“ – Cyclopeptide als Vorlage zum Design von Peptidmimetika

3.1 Konzept des „Conformational Designs“

Eine gängige Strategie in der Peptidchemie ist, makrocyclische Peptide als Template für das Design von kleinen Scaffolds zu verwenden. Durch die Synthese konformativ eingeschränkter, makrocyclischer Peptide wird versucht, die unbekannt rezeptorgebundene Konformation in einem möglichst kleinen Molekül „einzufrieren“ und diese mittels NMR-Spektroskopie zu analysieren.^[62,168,169] Basierend auf der NMR-Konformation werden passende Scaffolds gewählt und kombinatorisch mit geeigneten Resten funktionalisiert. Die verwendeten Scaffolds müssen in die makrocyclische Zone passen und so mit Substituenten versehen sein, dass diese die Seitenketten im biologisch aktiven Makrocyclus imitieren (Abb. 37). Diese Methode wurde von Kessler erfolgreich zur Entwicklung von RGD-Mimetika eingesetzt.^[170] Roberts zeigte bereits die biologische Aktivität eines Cyclohexapeptid-Analogons des Achetakinin I.^[83] Basierend auf dem vorgestellten Ansatz wurde Cyclohelicokinin I (**63**), die um eine Aminosäure erweiterten Valin- und Glycin-Analoga **64** und **65** sowie die um zwei und drei Glycin-Einheiten verlängerten Cyclohelicokinine **66** und **67** synthetisiert.

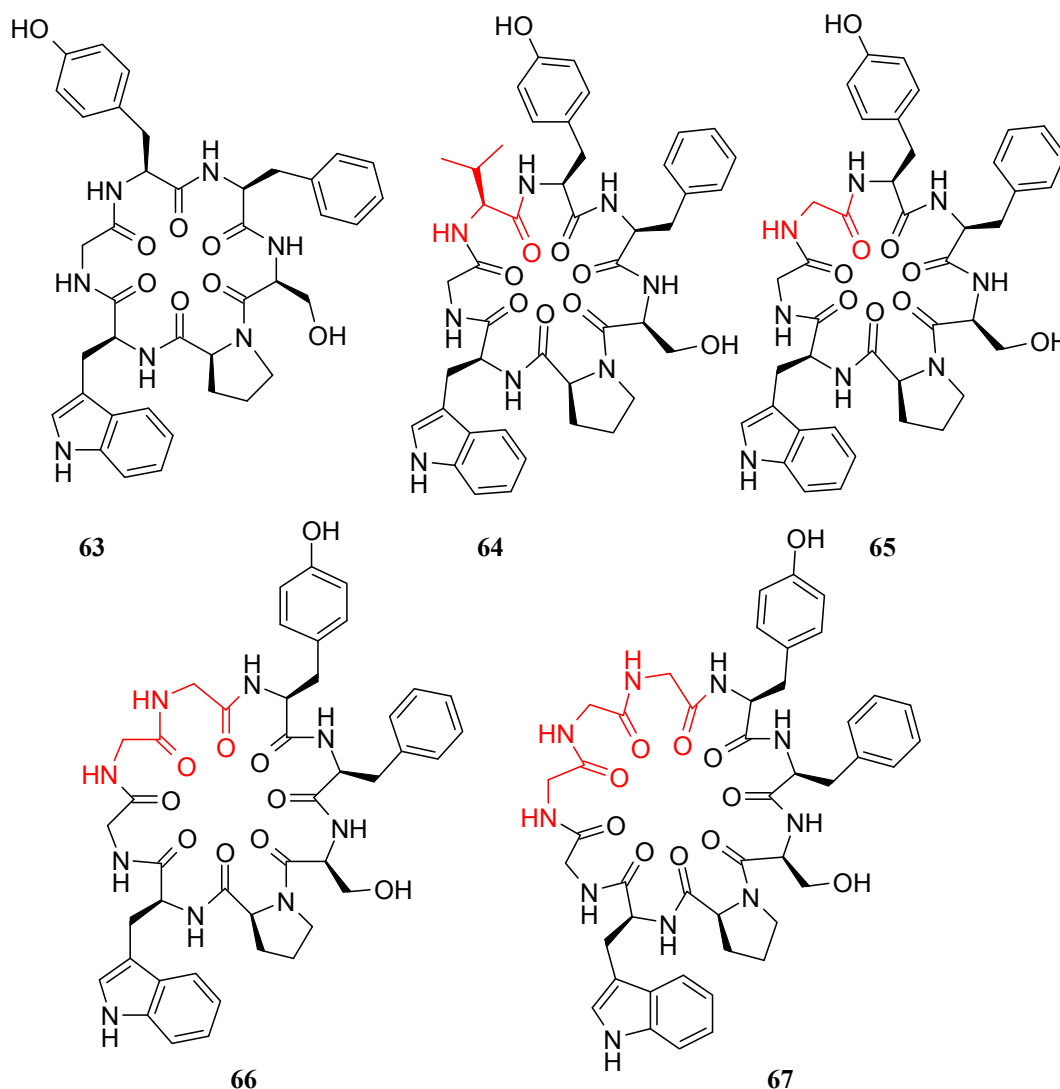
Abb. 37: Konzept des „Conformational Design“ - 1.: Ermittlung einer makrocyclischen Leitstruktur, 2.: Synthese und kombinatorische Funktionalisierung eines Scaffolds beispielhaft gezeigt an einem 1,4-Benzodiazepin, 3.: Overlay eines funktionalisierten Benzodiazepinon mit einer angenommenen Konformation des Cyclohelico-kinin I



3.2 Synthese cyclischer Helicokinin I-Analoga

Die Verwendung einer „Head-to-Tail“-Cyclisierung ermöglicht den Aufbau der in allen Peptiden vorhandenen linearen Hexapeptidkette (Gly bis Tyr) an der festen Phase. Als Trägermaterial wurde 2-Chlortrityl-Harz^[171] (**68**) verwendet, da dieses kompatibel zur Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie ist und eine milde Abspaltung unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen ermöglicht. Die Synthese der makrocyclischen Helicokinin Analoga ist in Schema 2 am Beispiel des Cyclohelicokinins erläutert. Die Synthese startet mit der Immobilisierung von Fmoc-Gly an der festen Phase. Der Aufbau des Hexapeptides erfolgte unter Verwendung der Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie und TBTU/HOBt-Aktivierung. Aufgrund der Säurelabilität

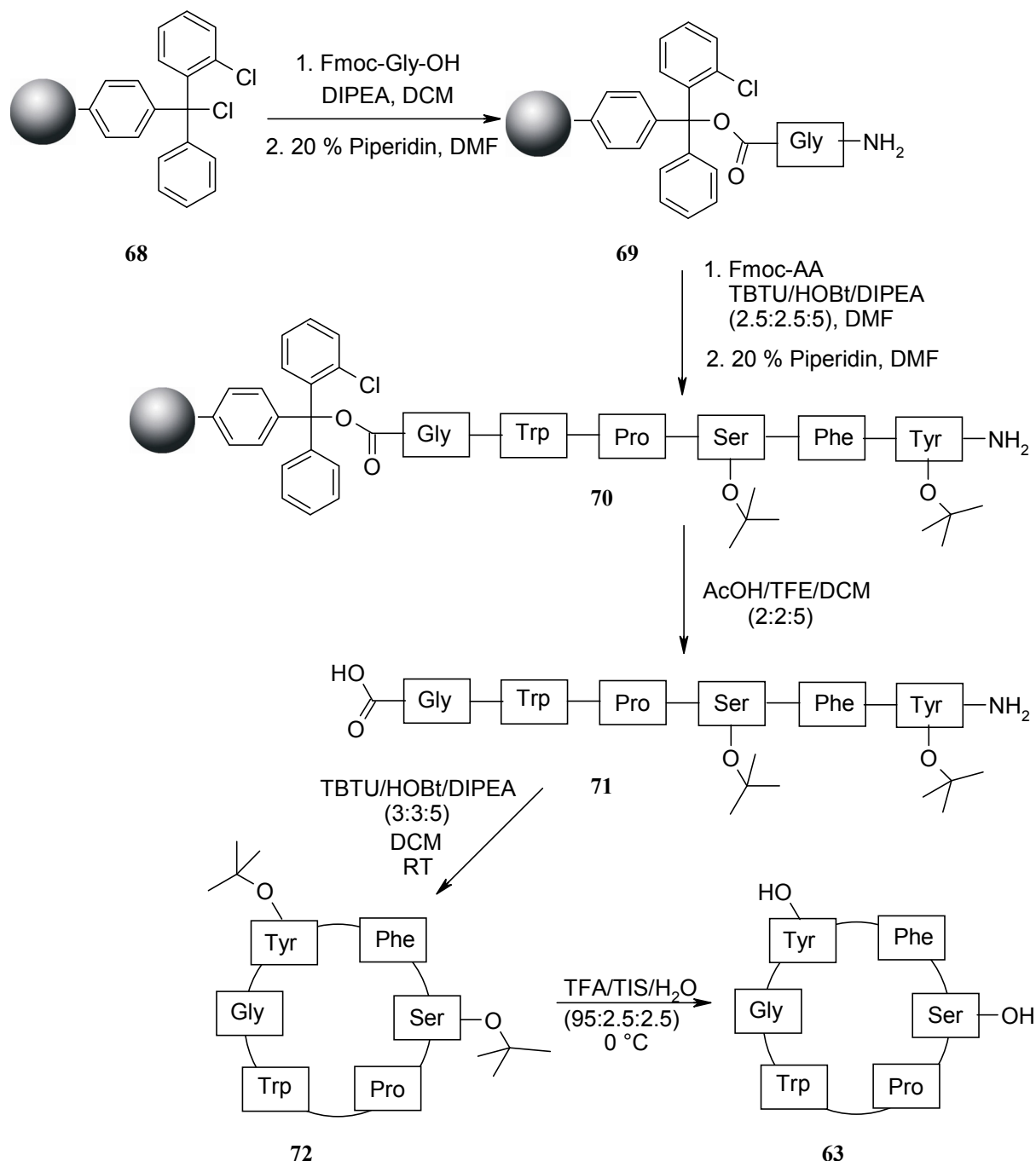
Abb. 38: Synthetisierte „Head-to-Tail“-cyclisierte Analoga des Helicokinin I



des Harzes wurde das lineare seitenkettengeschützte Hexapeptid **71** mit einem Gemisch aus AcOH/TFE/DCM (2:2:5) gespalten und in Lösung unter Hochverdünnung zum Makrocyclus **72** cyclisiert. Nach Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen mit TFA wurde das

Cyclohelicokinin I (**63**) erhalten. Bei der Synthese der größeren Makrocyclen wurden an das festphasengebundene, lineare Hexapeptid **70** die Spacerbausteine sukzessive angekuppelt. Die Synthese zu den Makrocyclen **64-67** erfolgte anschließend unter analogen Bedingungen wie zum Cyclohelicokinin I. Im Zuge der Lösungssynthese von Turn-Mimetika des Helicokinin I wurde das Fmoc- und seitenkettengeschützte Peptid Fmoc-Tyr(*t*Bu)-Phe-Ser(*t*Bu)-OH (**73**) ebenfalls am 2-Chlortritylchlorid-Harz synthetisiert.

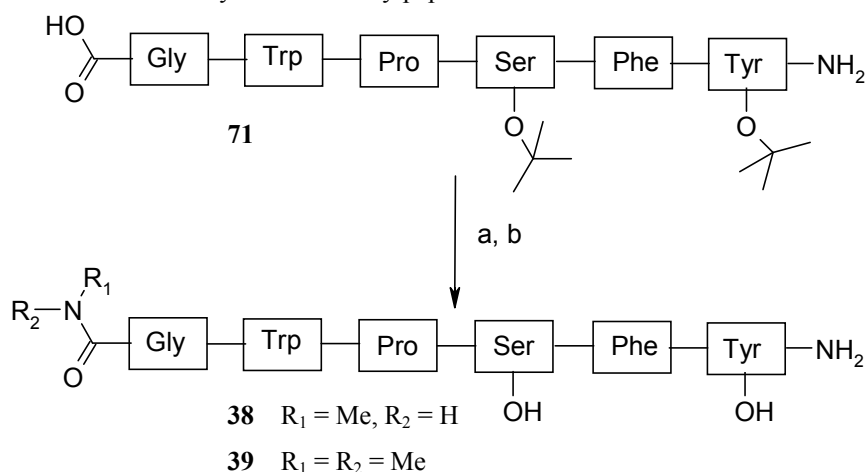
Schema 2: Synthese der makrocyclischen Helicokinin-Analoga am Beispiel des Cyclohelicokinin I (**63**)



Weiterhin wurde für die Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen das C-terminal monomethylierte und dimethylierte Helicokinin I (**38** bzw. **39**) synthetisiert. Ausgehend von der Säure **71** wur-

de die Amidierung mit einem großen Überschuss an Methylamin-Hydrochlorid (45 Äq.) bzw. Dimethylamin-Hydrochlorid (45 Äq.) und DIPEA (60 Äq.) unter Hochverdünnung durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise wurden unerwünschte intra- und intermolekulare Kupplungsreaktionen unterdrückt. Nach Entschützung mit TFA und Reinigung mittels semi-präparativer HPLC wurden beide Peptide in ausreichender Reinheit erhalten.

Schema 3: Synthese der Monomethyl- und Dimethylpeptidamide



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) MeNH_3Cl (bzw. $\text{Me}_2\text{NH}_2\text{Cl}$), EDC, DIPEA, RT, 24 h; b) TFA/TIS/ H_2O , 2 h, 0 °C.

3.3 Biologische Untersuchungen cyclischer Helicokinin I-Analoga

In den Rezeptor-Assays erwiesen sich die cyclischen Helicokinin I-Analoga als unwirksam (Tabelle 9), nur das Valin-Analogon **64** zeigt eine schwache Rezeptor-Aktivierung (680 nM). Für das Cyclohelicokinin I (**63**) ist zusätzlich die Aktivität im Ramsay-Assay bekannt. Während das Cyclopeptid **63** im Rezeptor-Assay vollkommen unwirksam ist, ist dessen Wirkung im Ramsay-Assay vergleichbar mit dem Helicokinin III (**7**). Verunreinigungen mit Helicokinin I (**5**) können ausgeschlossen werden, da die lineare Vorstufe als freie Carbonsäure vom 2-Chlortritylchlorid-Harz gespalten und anschließend in Lösung cyclisiert wurde. Sowohl für Säugetier- wie auch Insekten-Neuropeptide ist bekannt, dass die freie Carbonsäure inaktiv ist.^[30,82,83,132] Eine plausible Erklärung für diesen Effekt liegt möglicherweise in einer Aktivierung anderer diuretischer Rezeptoren in den malpighischen Gefäßen. Ebenfalls erscheint eine Beeinflussung der Ionenkanäle oder eine generelle Toxizität aufgrund eines ionophoren Effekts möglich, so dass im Organ-Assay ein falsch positives Ergebnis erhalten wird. Im Hinblick auf dieses Resultat sollte erwähnt werden, dass die biologischen Ergebnisse des von Nachman beschriebenen cyclischen Achetakininderivats cyclo(Ala-Phe-Phe-Pro-Trp-Gly) (**9**), aus dessen Wirksamkeit der VI β -Turn abgeleitet wurde, ebenfalls nur aus einem Organ-Assay stammen.^[88] Die biologische Relevanz des VI β -Turns bleibt deshalb ungeklärt.

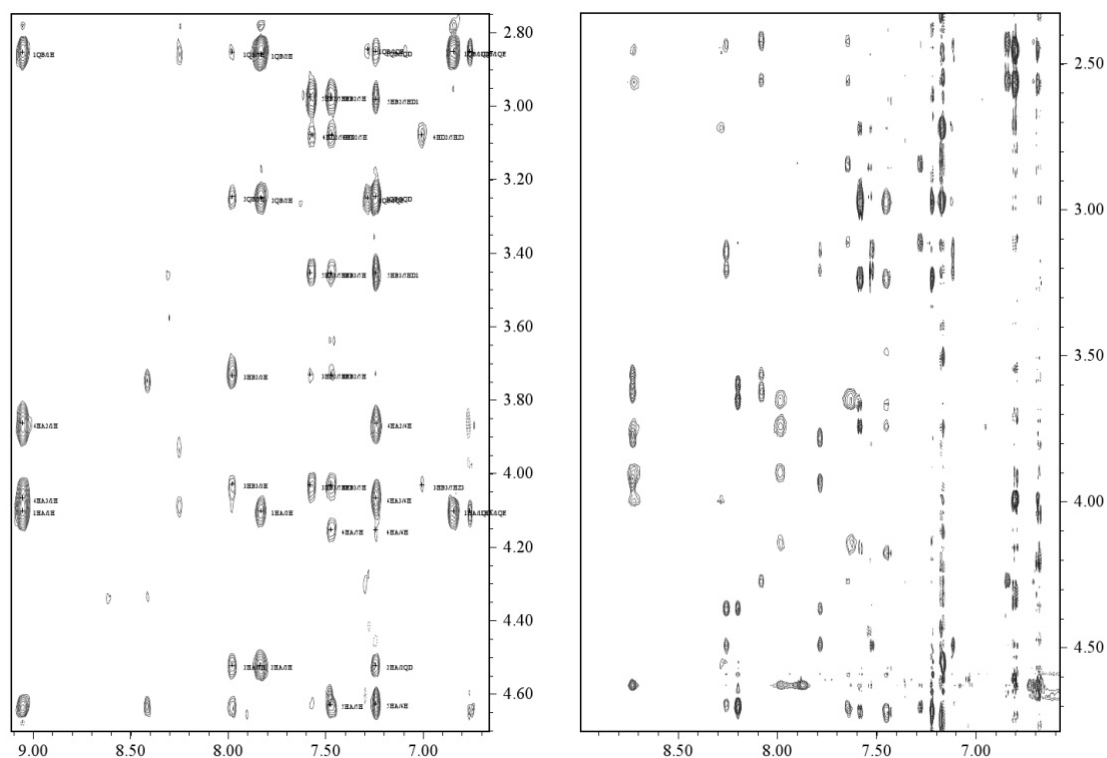
Tabelle 9: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der cyclischen Helicokinin-I Analoga

Verbindung	Sequenz	Ramsay-Assay [nl/min, 10 ⁻⁸ M]	Receptor-Assay EC ₅₀ [nM]
Helicokinin I (5)	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	7.3	2
Cyclohelicokinin I (63)	cyclo[Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly]	4.2	Inaktiv
64	cyclo[Val-Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly]	/	680
65	cyclo[Gly-Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly]	/	Inaktiv
66	cyclo[Gly-Gly-Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly]	/	Inaktiv
67	cyclo[Gly-Gly-Gly-Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly]	/	Inaktiv

3.4 Konformationsanalysen cyclischer Helicokinin I-Analoga

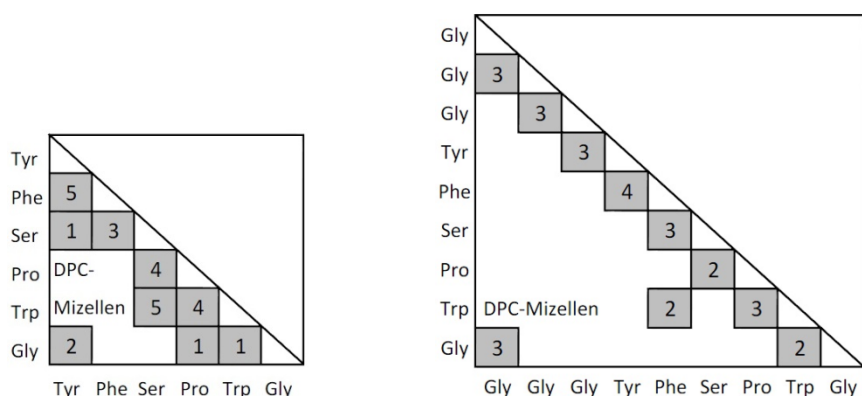
Die Analyse cyclischer Peptide verspricht weitere Hinweise auf die „biologisch aktive“ Konformation zu liefern. Der im vorangegangenen Kapitel beschriebene Verlust der biologischen Aktivität kann nicht ausschließlich durch Alkylierung des C-terminalen Amids erklärt werden. Daher scheinen konformative Voraussetzungen ebenfalls eine bedeutende Rolle zu spielen. Die Messungen der Cyclopeptide an DPC-Mizellen lieferten für das Peptid **63** ein *trans/cis*-Isomerenmischung (80/20). Die Spektren zeigen eine ausreichende Anzahl an NOEs, aus denen die in Abb. 41 gezeigte Konformation des Hauptisomers ermittelt wurde. Die Spektren des Cyclononapeptids **67** zeigen keine Hinweise auf unterschiedliche Konformere. Erwartungsgemäß ist die Struktur besonders im Bereich der zusätzlichen Glycine deutlich

Abb. 39: NOESY-Spektren des Cyclohelicokinin I (**63**, links) und des Cyclopeptids **65** (rechts) im Amid-Bereich.



flexibler als das Cyclohelicokinin I (**63**). Der I β -Turn bleibt analog dem natürlichen Helicokinin I (**5**) mit den inneren Aminosäuren Prolin und Tryptophan auch in den cyclischen Peptiden intakt. Deshalb kann die Ursache für die Inaktivität nicht in der Turn-Struktur liegen. Bemerkenswerterweise nimmt das pharmakologisch wichtige Phenylalanin sowohl im Cyclohelicokinin (**63**) als auch im sehr flexiblen Cyclononapeptid **67** eine zum unmodifizierten Helicokinin I deutlich unterschiedliche Orientierung ein. Dies kann als Ursache für die komplette Inaktivität der Makrocyclen im Rezeptor-Screening gedeutet werden.

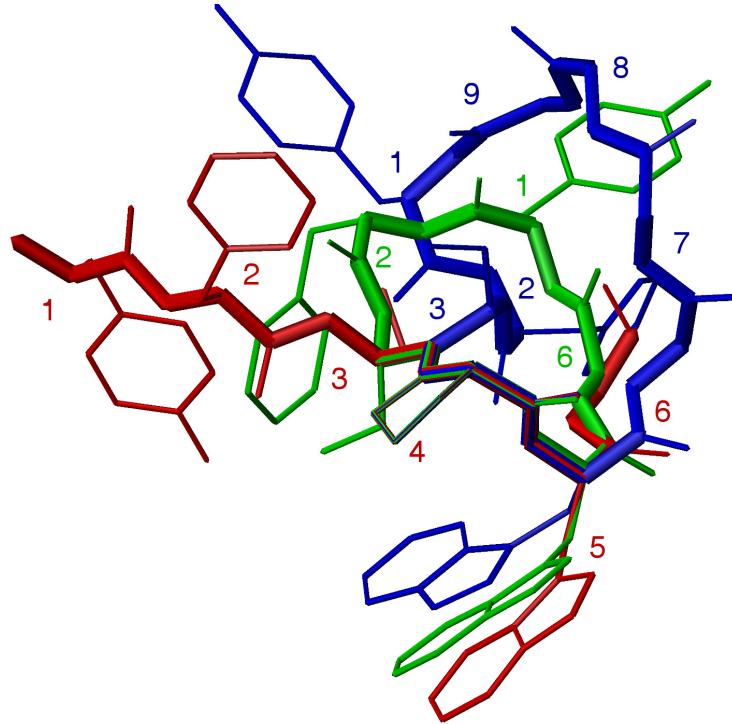
Abb. 40: Anzahl der signifikanten interresiduellen NOEs des Cyclohexapeptids **63** (links) und Cyclononapeptids **67** (rechts)



Die cyclischen Hepta- und Octapeptide **64**, **65** und **66** zeigen eine Vielzahl an Signalsätzen. Dies kann als Hinweis auf eine verminderte Affinität zur Membran und einer erhöhten Flexibilität der Peptide angesehen werden. Aufgrund der hohen Anzahl an Konformeren und der damit verbundenen Signalüberlappung war eine eindeutige Bestimmung der Konformationen nicht möglich. Analog zu den Cyclopeptiden **63** und **67** ist durch die Cyclisierung auch bei den Hepta- und Octapeptiden eine deutliche räumliche Abweichung der aromatischen Seitenkette des Phenylalanins zu erwarten. Hierin liegt höchstwahrscheinlich die Ursache für die Unwirksamkeit der Peptide **65** und **66** im Rezeptor-Screening begründet. Das Cyclopeptid **64** zeigt im Rezeptor-Assay eine um den Faktor 340 reduzierte Aktivität. Die durchgeführten Konformationsuntersuchungen lassen jedoch keine Rückschlüsse auf eine mögliche Ursache für die Aktivität des Cycloheptapeptids **64** zu. Im Hinblick auf das flexiblere, unwirksame Glycin-Analogon **65** ist davon auszugehen, dass das Valin aufgrund des sterisch anspruchsvollen Isopropyl-Restes eine Konformation induziert, in der die pharmakophoren Seitenketten des Phenylalanins und Tryptophans eine geeignete räumliche Orientierung aufweisen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der „Head-to-Tail“-cyclisierten Peptid-Analoga erscheint diese Strategie auf die Suche nach Helicokinin-Analoga nicht anwendbar zu sein. Ganz im

Gegenteil zu den Integrin-Antagonisten, wo von Kessler sehr erfolgreich das „Conformational Design“ angewendet wurde.

Abb. 41: Überlagerung von Helicokinin I (**5**, rot) und den cyclischen Analoga **19** (grün) und **23** (blau)

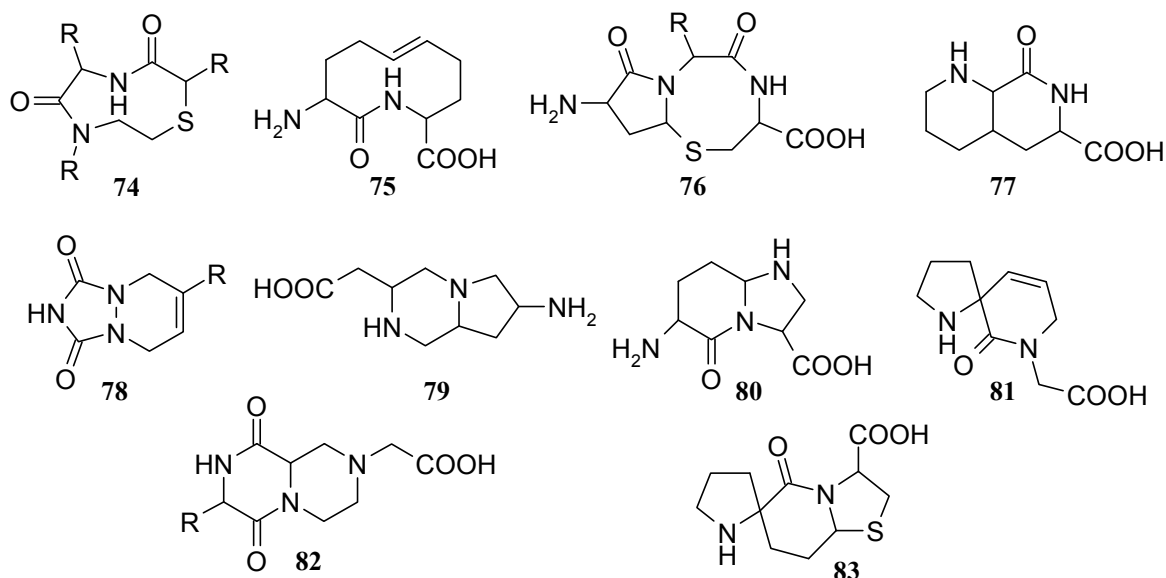


4. Konformativ eingeschränkte β -Turn Mimetika

4.1 Wahl geeigneter β -Turn Mimetika

Seit der Identifizierung von β -Turns als wichtige Sekundär- und Erkennungsstrukturelemente hat es nicht an Versuchen gefehlt, Turn-Mimetika zu synthetisieren und unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität in Peptide zu integrieren. Die Möglichkeiten zur Stabilisierung von Sekundärstrukturelementen wurden bereits beschrieben. Die Synthese maßgeschneiderter Turn-Mimetika, für den C-terminalen β -Turn des Helicokinin I stellt das Hauptziel des zweiten Teils dieser Arbeit dar. In Übereinstimmung mit den Struktur-Wirkungs-Beziehungen müssen bei der Auswahl geeigneter Turnmimetika folgende Kriterien erfüllt sein:

- das C-terminale Glycinamid muss die gleiche räumliche Orientierung wie im β -Turn des Helicokinin I besitzen,
- die Indol-Seitenkette darf nicht ersetzt werden und
- die Aminogruppe des Serins muss aufgrund ihrer Orientierung eine geeignete räumliche Anordnung der fehlenden Peptidkette besonders der Phenylalanin-Seitenkette ermöglichen.

Abb. 42: Auf Übereinstimmung mit dem I β -Turn des Helicokinins untersuchte β -Turn Mimetika

Eine Anzahl literaturbekannter β -Turn-Mimetika^[172-181] wurde mit Hilfe der Modelling-Software Chem3D auf ihre Übereinstimmung mit dem I β -Turn des Helicokinin I untersucht. Interne β -Turn Mimetika scheinen für Helicokinin-Peptidomimetika zweckmäßig zu sein, da diese eine Funktionalisierung mit der biologisch wichtigen Indol-Seitenkette erlauben. Bei externen Turn-Mimetika ist dies nicht möglich, da die Templatatome die richtige räumliche Anordnung der Indol-Seitenkette verhindern.

Als besonders geeignet erwies sich aufgrund der Modelling-Ergebnisse das bicyclische Turn-Mimetikum **84**. Prolin wurde in den potenziellen Mimetika durch Valin ersetzt, um eine Anbringung der *N*-terminalen Peptidkette zu ermöglichen. Beide Aminosäuren besitzen sowohl einen ähnlichen Raumspruch als auch analoge Affinitäten zu Membranen.^[70] Zu Vergleichszwecken sind die flexibleren C₂- bzw. C₄-verbrückten Cyclen **85** und **86** interessant, da diese eine gewisse konformative Anpassung an den Rezeptor erlauben. Das Turnmimetikum **85** ist von dem von Ellman vorgestellten 1,4,7-Thiadiazonan-3,6-dion **74** abgeleitet, das bereits erfolgreich in der Synthese von Integrin-Liganden Anwendung fand.^[172,173]

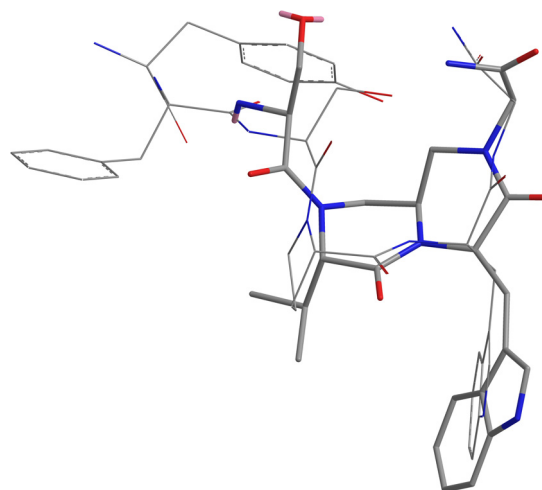
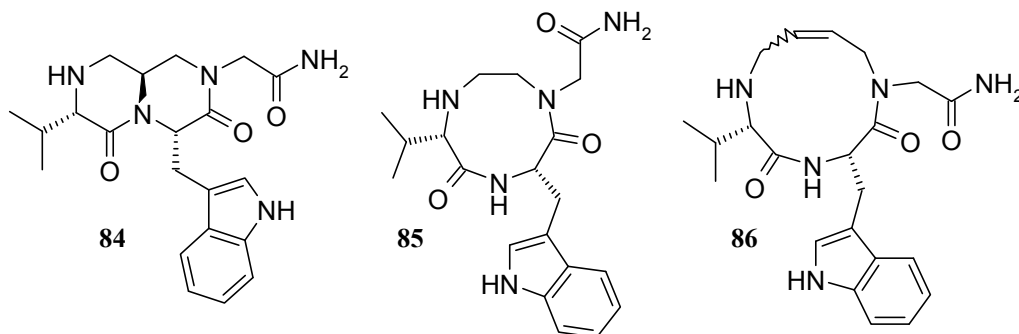
Abb. 43: Fit des bicyclischen Turnmimetikums **84** (dick) auf den C-terminalen Turn des Helicokinin I

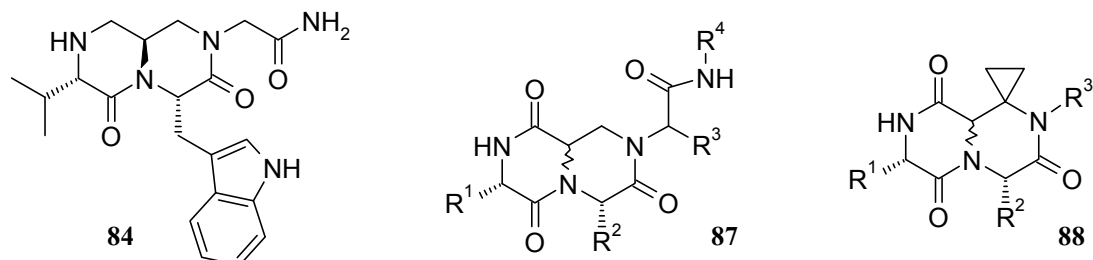
Abb. 44: Mimetika für den C-terminalen β -Turn im membrangebundenen Helicokinin I

4.2 Synthese der Mimetika

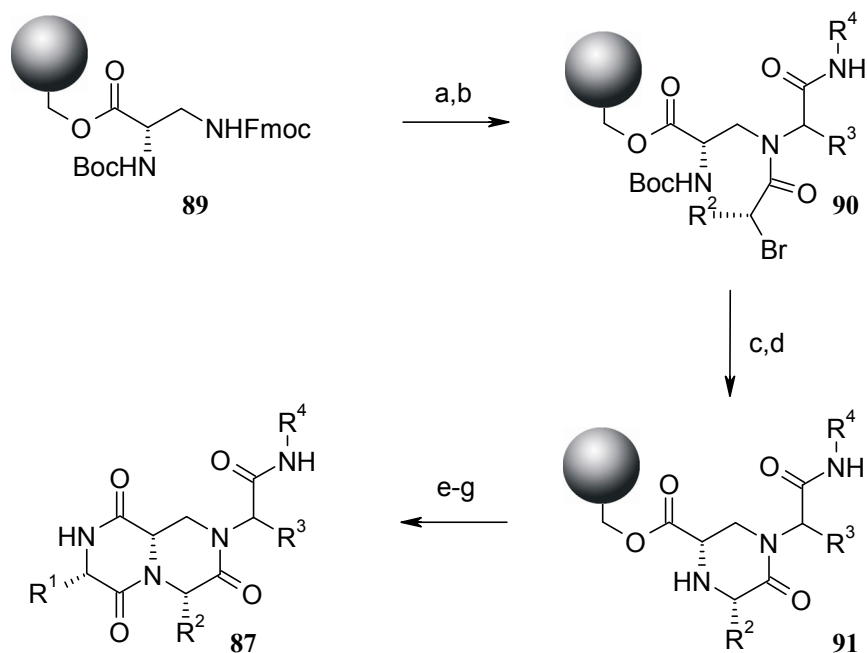
4.2.1 Synthese des Octahydro-pyrazino[1,2-*a*]pyrazin-3,6-dions

4.2.1.1 Bekannte Synthesen analoger Verbindungen

Das geplante bicyclische Turnmimetikum **84** besitzt ein Octahydro-[2*H*]-pyrazino-[1,2-*a*]-pyrazin-3,6-dion-Grundgerüst. Es stellt sowohl eine interessante Substanzklasse als auch ein potenzielles β -Turnmimetikum dar und ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Die Synthese analoger Octahydro-[2*H*]-pyrazino-[1,2-*a*]-pyrazin-3,6,9-trione^[182,183] **87** und Perhydrospiro-(cyclopropan-1,1'-[2*H*]-pyrazino-[1,2-*a*]-pyrazin)-3',6',9'-trione^[184,185] **88** als potenzielle β -Turnmimetika, wurde in jeweils zwei Literaturstellen beschrieben.

Abb. 45: Pyrazinopyrazindion **84**, Pyrazinopyrazintrion **87** und Spiropyrazinopyrazintrion **88**

In beiden Grundgerüsten liegen alle Stickstoffatome als Amid vor. Dadurch wird eine regioselektive Verknüpfung mit dem fehlenden Tripeptid deutlich erschwert. Die von Golebiowski^[182,183] vorgestellte Synthese von Verbindungen des Typs **87** verwendet eine Ugi-Reaktion als Kernschritt zum Aufbau des Peptids. Die Anwendung dieser Syntheseroute auf Helicokinin-Analoga erscheint jedoch problematisch. Das benötigte Isonitril-Synthon muss selektiv vom Stickstoff spaltbar sein und ein unsubstituiertes endständiges Amid liefern.

Schema 4: Synthese des Turnmimetikum **87** nach Golebiowski

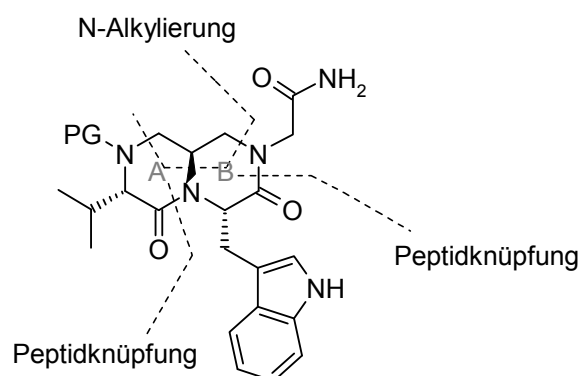
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Piperidin, DMF, 30 min; b) Aldehyd (5 Äq.), Isocyanid (5 Äq.), (R)-(+)-2-Bromalkylsäure, MeOH/CHCl₃ (1:4), RT, 2x 2 h; c) TFA, DCM; d) DIPEA, DCM, RT, 18 h; e) Boc-Aminosäure, NMM, Isobutylchlorformiat, THF/DMF; f) TFA, DCM; 2 M AcOH, ⁱPrOH, 60 °C, 18 h.

Bei der von Belov^[185] vorgestellten und von Limbach^[184] optimierten Synthese, entsteht das Produkt aufgrund der verwendeten Edukte als Epimerengemisch. Weiterhin sind ausschließlich aliphatische Reste für R³ beschrieben, wodurch sich wiederum Probleme bei der Anwendung der Synthese auf das Helicokin I-Analogon **84** ergeben könnten. Aufgrund der genannten Argumente wurde dem Turnmimetikum **84** der Vorzug gegeben.

4.2.1.2 Retrosynthetische Überlegungen zum bicyclischen Turnmimetikum

In Abb. 46 sind die möglichen Verknüpfungen zum Aufbau des bicyclischen Turnmimetikums dargestellt. Der Bicyclus **84** kann auf kommerziell erhältliche Aminosäuren

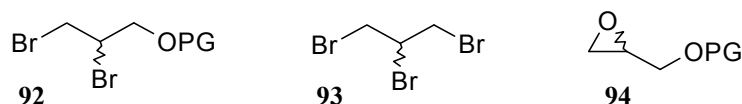
Abb. 46: Mögliche retrosynthetische Schnitte zur Synthese des Pyrazinopyrazinons **84**.



zurückgeführt werden, die im Verlauf der Synthese durch Alkylierungsreaktionen mit der C₃-Brücke verknüpft werden. Eine besondere Bedeutung besitzt die Wahl eines geeigneten C₃-Bausteins. Hierbei bieten sich 1,2,3-funktionalisierte Propanderivate wie *O*-geschützte 2,3-Dibrompropanole **92** oder 1,2,3-Tribrompropan (**93**) an. Geschütztes Glycidol **94** ist ebenfalls ein geeigneter C₃-Baustein, da das Epoxid als Schutzgruppe

fungiert und beide enantiomerenreinen Formen kommerziell erhältlich sind. Just zeigte bereits im Jahr 2000, dass der Aufbau 5,6-unsubstituierter 2-Ketopiperazine durch Alkylierung von Nosyl-Dipeptiden mit 1,2-Dibromethan möglich ist.^[186] Durch Ausweitung dieser Methode auf *O*-geschütztes 2,3-Dibrompropanol soll in der eigenen Synthese zunächst das 2-Ketopiperazin (Ring A) aufgebaut werden. Anschließende Funktionalisierung des C-Terminus und erneute Alkylierung liefern nach Ringschluss (Ring B) das Pyrazinopyrazinon.

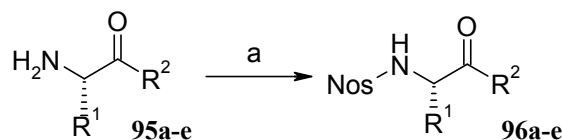
Abb. 47: Geeignete C₃-Bausteine



4.2.1.3 Synthese von *N*-Nosyl-Aminosäuren als zentrale-Bausteine

Für die Darstellung der Turnmimetika stellen Nosyl-geschützte Aminosäurederivate geeignete Ausgangsstoffe dar. Diese weisen exzellente Ausbeuten sowohl in Fukuyama-Alkylierung^[187,188] wie auch in Fukuyama-Mitsunobu-Reaktion^[189-191] auf. Da im Zuge dieser Arbeit verschiedene Nosyl-Aminosäurederivate synthetisiert wurden, soll deren Darstellung an dieser Stelle zusammengefasst werden. Durch Umsetzung mit Nosyl-Cl in Dichlormethan wurden die gezeigten Nosyl-Valin- und Nosyl-Glycinderivate in guter Ausbeute dargestellt (Schema 5, Tabelle 10).^[192]

Schema 5: Darstellung der Nosyl-Aminosäuren



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Nosyl-Cl, TEA, DCM, 0 °C, 16 h, 70–93 %.

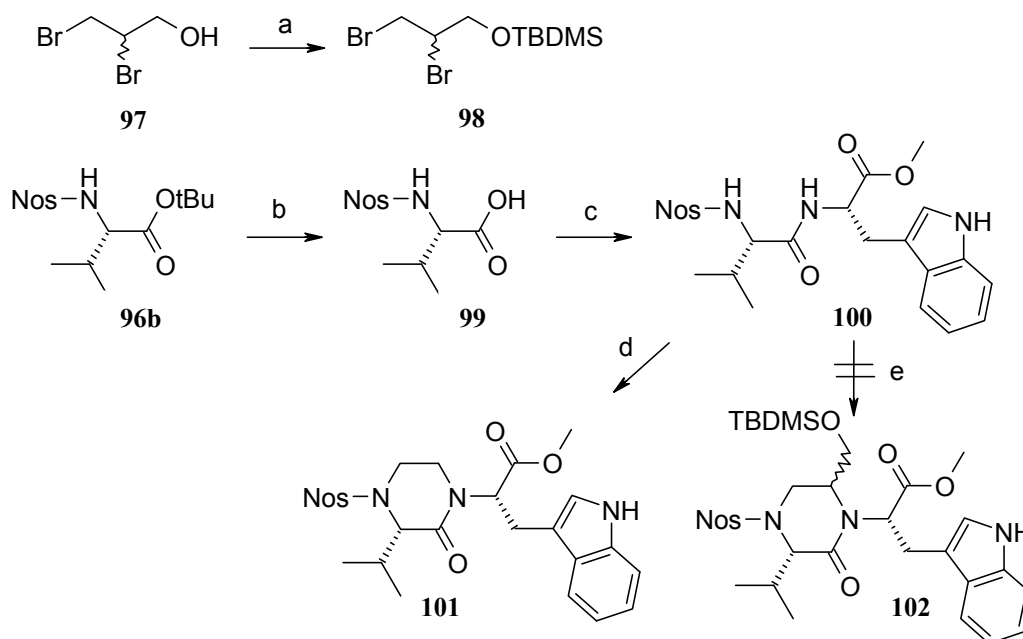
Die Aminosäurederivate **95a**, **95b** und **95e** wurden als Hydrochloride eingesetzt, Edukt **95d** als freies Amin und **95c** als das kommerziell erhältliche *p*-Toluolsulfonsäuresalz. Alle Produkte wurden säulenchromatographisch gereinigt, mit Ausnahme des Produkts **96e**. Dieses Nosylamin wurde aufgrund seiner geringen Löslichkeit in unpolaren, für die Chromatographie häufig verwendeten Solventien aus einem Ethanol/Wasser-Gemisch umkristallisiert.

Tabelle 10: Hergestellte Nosyl-Aminosäurederivate

	R ¹	R ²	Aufreinigung	Ausbeute
96a	(CH ₃) ₂ CH	OMe	Säulenchromatographie (DCM)	93 %
96b	(CH ₃) ₂ CH	O <i>t</i> Bu	Säulenchromatographie (DCM)	87 %
96c	(CH ₃) ₂ CH	OBn	Säulenchromatographie (CH/EE, 7:3)	89 %
96d	H	O <i>t</i> Bu	Säulenchromatographie (DCM)	75 %
96e	H	NH ₂	Umkristallisation (H ₂ O/Ethanol)	70 %

4.2.1.4 Syntheseversuch mit 2,3-Dibrompropanderivaten als C₃-Baustein

Das benötigte TBDMS-geschützte 2,3-Dibrompropanol **98** wurde nach einer Vorschrift von Corey in 68 % Ausbeute hergestellt.^[193] Das Dipeptid **100** wurde ausgehend von **96b** in zwei Stufen hergestellt. Zuerst wurde der *tert*-Butylester sauer gespalten und die entstandene Säure **99** an Tryptophanmethylester (**156**) gekuppelt.

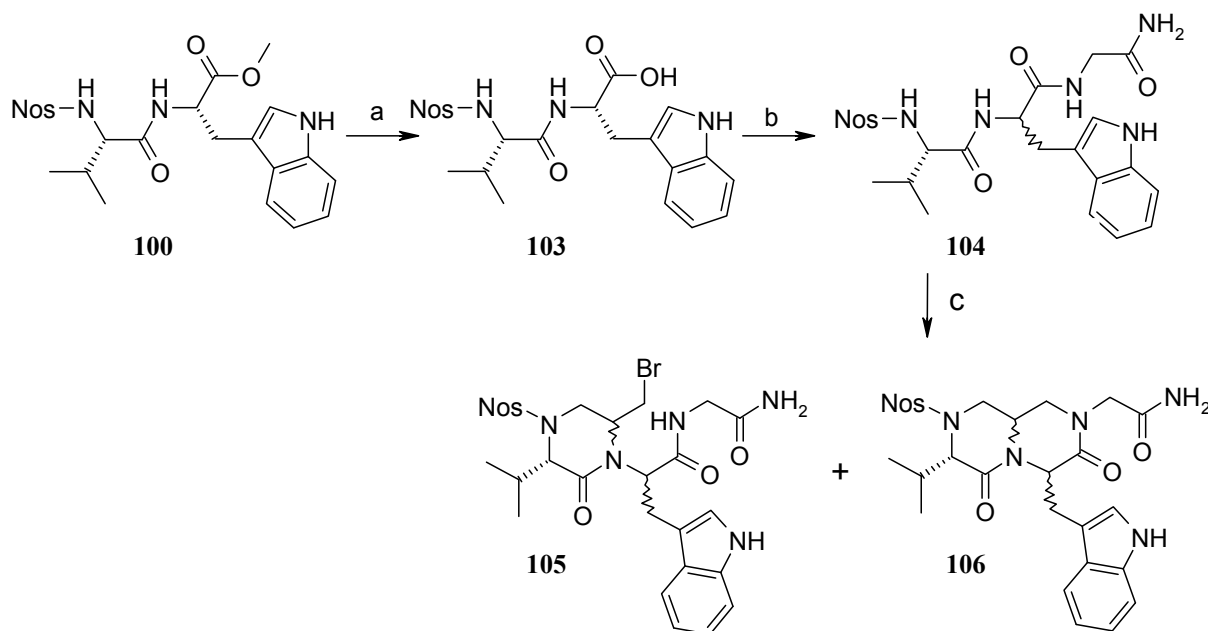
Schema 6: Versuche zur Alkylierung zum 2-Ketopiperazin

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Imidazol, TBDMS-Cl, DMF, RT, 2 d, 68 %; b) TFA/DCM (1:1), 0 °C, 2 h, 90 %; c) Tryptophanmethylester, TBTU, DIPEA, DCM, 44 h, 89 % d) 1,2-Dibromethan, K₂CO₃, DMF, 48 h, 60 °C, 65 %. e) **98**, Cs₂CO₃ oder DBU, DMF, 60 °C.

Die Herstellung von in Position 5 und 6 unsubstituierten 2-Ketopiperazinen wird in der Literatur mit dem Dibromethan und Kaliumcarbonat beschrieben. Die Umsetzung des Dipeptids **100** mit Dibrompropan **98** zum Ketopiperazin **102** war unter diesen Bedingungen nicht erfolgreich. Auch mit DBU fand keine Umsetzung statt. Daher wurde untersucht, ob sich das Dipeptid **100** mit unsubstituiertem 1,2-Dibromethan alkylieren lässt. Dies gelang in einer Aus-

beute von 65 %.^[186,194,195] Das Ketopiperazin **101** ist aufgrund seiner konformativen Fixierung ein interessantes Dipeptidmimetikum. Ein Grund für die misslungene Alkylierung mit **98** liegt vermutlich in der sterischen Hinderung durch die TBDMS-Gruppe. Eine Instabilität des Silylethers unter den verwendeten Reaktionsbedingungen ist ebenfalls nicht auszuschließen, wenn auch die HPLC-MS-Analyse der Rohprodukte keine Hinweise auf eine Zersetzung lieferte. Basierend auf der erfolgreichen Kupplung zum Ketopiperazin **101** wurde untersucht, ob sich diese Reaktionsbedingungen auf ein tripeptidisches System übertragen lassen. Der Methyl ester **100** wurde mit Lithiumhydroxid verseift. Die anschließende Kupplung an Glycinamid ergab das Tripeptid **104** als Diastereomerenmischung (1:1). Eine Epimerisierung des Stereozentrums wurde ebenfalls bei der Kupplung der Säure **159** an *N*-Allyl-Glycinamid (**151**) beobachtet. Aus der Kupplung zum Tripeptid **104** wird ersichtlich, dass die Epimerisierung nicht im Zusammenhang mit der Kupplung an ein sekundäres Amin steht. Die Nosyl-Gruppe besitzt hingegen einen wichtigen Einfluss auf die Epimerisierung. Dies belegten im späteren Syntheseverlauf Kupplungen von anderweitig geschützten dipeptidischen Strukturen an Glycinamid, da dort keine Epimerisierung auftrat (S. 65/S. 68). Systematische Untersuchungen zur Kupplung von Nosyl-Dipeptiden an Amine wurden bisher nicht durchgeführt, sind jedoch zur Optimierung der Kupplungsbedingungen essenziell.

Schema 7: Alkylierung des Tripeptids **104**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) LiOH, THF/H₂O, 3 h, RT, 99 %; b) Gly-NH₂*HCl, TBTU, DIPEA, RT, 48 h, 87 %; c) 1,2,3-Tribromopropan, Base, DMF, 48 h, 60 °C.

Analog der Kupplung von **159** kann eine Epimerisierung durch Verwendung von BOP-Cl als Kupplungsreagenz verhindert werden.

Die Reaktionsbedingungen zur Alkylierung des Dipeptides waren nicht auf das Tripeptid und Tribrompropan übertragbar. Die Ergebnisse der durchgeführten Reaktionen sind in

Tabelle 11 zusammengefasst. Die Umsetzung mit 20 Äq. Kaliumcarbonat lieferte als einzige Reaktion eine geringe Menge der bicyclischen Verbindung **106**, neben dem monocyclischen 2-Ketopiperazin **105** als Hauptprodukt. Die Umsetzung mit anderen Basen lieferte ausschließlich den Monocyclus oder zeigte keine Reaktion. Der Bicyclus **106** konnte nicht durch Säulenchromatographie vom Monocyclus **105** abgetrennt werden. Noch schwieriger ist die weitere Auftrennung der entstandenen Diastereomere, deren Bildung aufgrund der Verwendung eines racemischen C₃-Bausteins nicht vermeidbar ist. Aufgrund der Probleme bei der chromatographischen Trennung der Produkte und der geringen Ausbeute wurden letztendlich ausschließlich enantiomerenreine C₃-Bausteine verwendet.

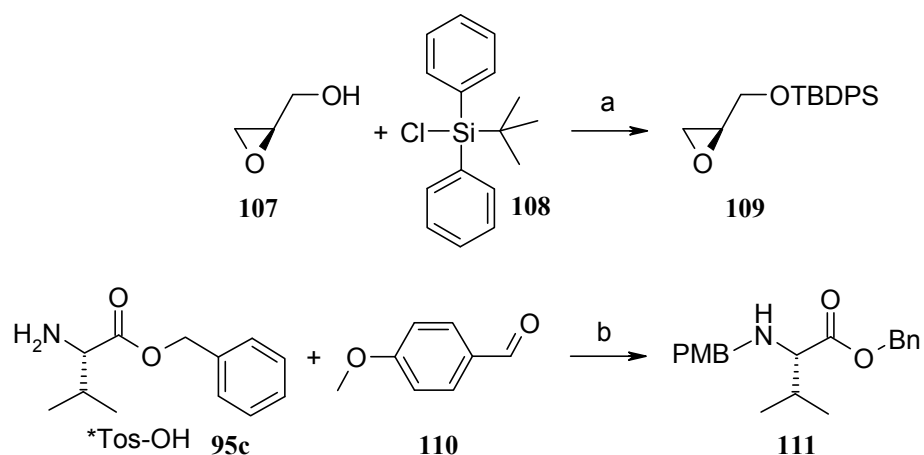
Tabelle 11: Alkylierung des Tripeptids **104**

Base	Umsatz
10 Äq. DBU	Kein Umsatz
10 Äq. NaH	25 %, 105
10 Äq. KO _t Bu	22 %, 105
10 Äq. K ₂ CO ₃	29 %, 105
20 Äq. K ₂ CO ₃	11 % 106 , 56 % 105

4.2.1.5 Synthese mit Glycidol als enantiomerenreiner C₃-Baustein

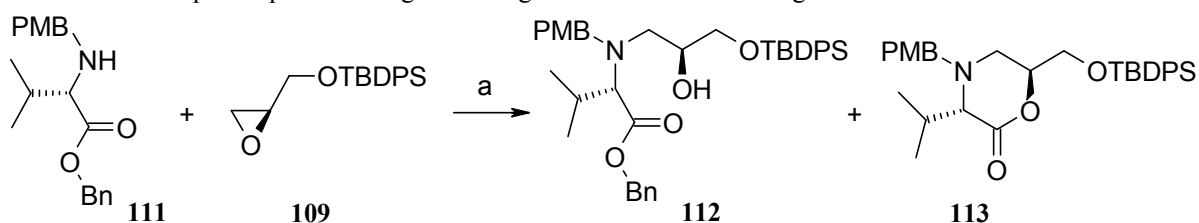
Wie bereits in den retrosynthetischen Überlegungen beschrieben, ist Glycidol (**107**) ein geeigneter Baustein für die Entwicklung einer Syntheseroute des enantiomerenreinen Pyrazinopyrazinons. Beide Enantiomere sind zu einem moderaten Preis kommerziell verfügbar. Glycidol wurde zunächst als *tert*-Butyldiphenylsilylether in 85 % Ausbeute geschützt.^[196]

Als nukleophiles Valinderivat wurde *para*-Methoxybenzyl-geschützter Valinbenzylester **111** verwendet. Dieser war durch reduktive Aminierung aus Valinbenzylester *p*-tosylat **95c** mit Anisaldehyd **110** in exzellenter Ausbeute (95 %) zugänglich.^[197]

Schema 8: Herstellung der Edukte für die Epoxidöffnung

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) TEA, DCM, RT, 16 h, 85 %; b) NaBH₃CN, MeOH, RT, 15 h, 95 %.

Die nukleophile Epoxidöffnung wurde unter zahlreichen Bedingungen getestet. Eine in der Literatur beschriebene Methode zur Öffnung von Glycidolderivaten mit Isopropylbenzylamin lieferte auch nach 10 Tagen Reaktionszeit nur mäßige Ausbeuten.^[198,199] Hauptprodukt war allerdings nicht der gewünschte Alkohol **112**, sondern das cyclisierte 2-Ketomorpholin **113**. Dieses entsteht durch einen nukleophilen Angriff der Hydroxyfunktion auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Valins unter Abspaltung von Benzylalkohol. Porco und Panek beschrieben 2007 die Epoxidöffnung verschiedener Glycidolderivate mit Pipecolateestern unter Magnesiumtriflataktivierung.^[200] Im Folgenden wurde die Epoxidöffnung mit verschiedenen Lewis-Säuren in unterschiedlichen Lösungsmitteln getestet. Die Ergebnisse der Optimierung sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Schema 9: nukleophile Epoxidöffnung unter Magnesiumtriflat-Aktivierung

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Lewis-Säure.

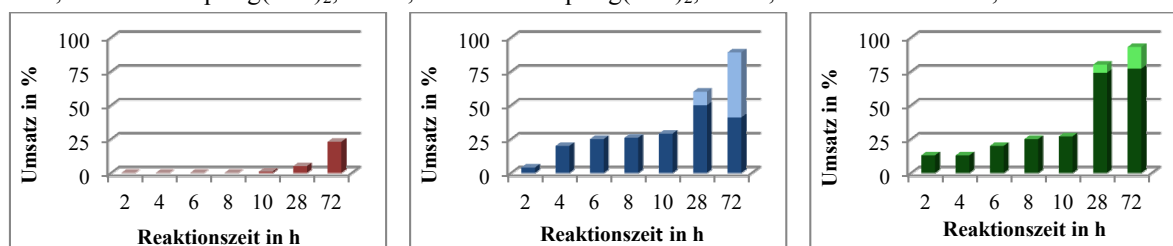
Tabelle 12: Optimierung der Lewis-Säure katalysierten Oxiranöffnung

Lösungsmittel	Lewis Säure	Temperatur	Dauer	Umsatz
Methanol	-	Rückfluss	10 d	25 % ¹⁾ 113
Methanol	-	Rückfluss	4 d	10 % ¹⁾ , 112/113 2:1
Methanol	Cu(OTf) ₂	RT	4 d	kein Umsatz ³⁾
		50 °C ⁴⁾	3 d	1/0.59/0 ²⁾
		Rückfluss ⁴⁾	24 h	1/1.83/1.46 ²⁾
	Mg(OTf) ₂	75 °C	16 h	1/1.7/0.2 ²⁾ , zusätzlich unbekanntes Nebenprodukt
		75 °C	36 h	0/15.8/4.4 ²⁾ , zusätzlich unbekanntes Nebenprodukt
MeCN	Cu(OTf) ₂	75 °C	15 h	kein Umsatz ³⁾
		75 °C ⁴⁾	9 h	kein Umsatz ³⁾
	Mg(OTf) ₂	75 °C	16 h	1:1.7:0.1 ²⁾
		75 °C ⁴⁾	36 h	1:7.7:4.4 ²⁾
THF	SnCl ₄	60 °C	42 h	kein Produkt/große Menge Nebenprodukte
	BF ₃ *Et ₂ O	60 °C	42 h	geringe Mengen 112 , kein Cyclisierungsprodukt 113 , kein Epoxid 109 , zahlreiche Nebenprodukte
Benzol	SnCl ₄	60 °C	42 h	0:1:0.66 ²⁾ , weitere Nebenprodukte
	BF ₃ *Et ₂ O	60 °C	42 h	kein Epoxid, kein Produkt 112 , kein Cyclisierungsprodukt 113 , zahlreiche Nebenprodukte
	Mg(OTf) ₂	75 °C	16 h	kein Umsatz

¹⁾ Isolierte Ausbeute, ²⁾ Verhältnis **109/112/113** laut HPLC-MS bei 220 nm nach wässriger Aufarbeitung, ³⁾ DC-Kontrolle ⁴⁾ Die über dem Eintrag verwendete Reaktion wurde unter diesen Bedingungen fortgesetzt.

Das beste Ergebnis wurde mit Magnesiumtriflat in Acetonitril erzielt. Anders als in den Umsetzungen mit reaktiveren Lewis-Säuren wurde hier keine Zersetzung der Substrate festgestellt. Das Produktgemisch **112/113** war durch Kieselgelchromatographie nicht trennbar. Deshalb wurden die Reaktionsparameter (Zeit, Temperatur, Magnesiumtriflatmenge) hinsichtlich eines verbesserten **112/113**-Verhältnisses optimiert.

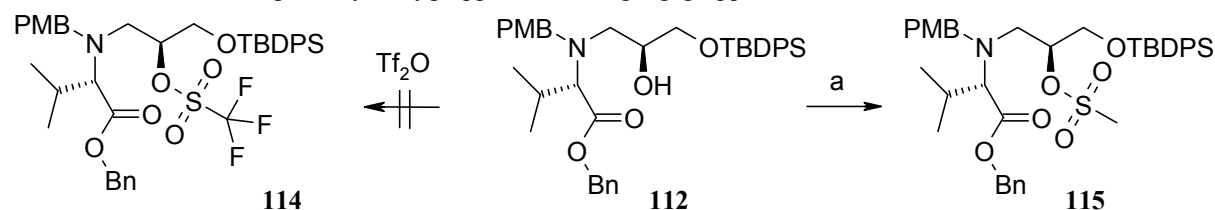
Abb. 48: Reaktionsumsatz der Epoxidöffnung in Abhängigkeit der Reaktionszeit; links: 1.1 Äq. Mg(OTf)₂, 50 °C; mitte: 2.2 Äq. Mg(OTf)₂, 75 °C; rechts: 1.1 Äq. Mg(OTf)₂, 75 °C; dunkle Balken: **112**; helle Balken: **113**



Das beste Ergebnis lieferten 1.1 Äquivalente Magnesiumtriflat und eine Temperatur von 75 °C. Bei der Verwendung von 2.2 Äquivalenten Lewis-Säure verschob sich das Produktverhältnis stark hin zur cyclisierten Verbindung **113**. Bei einer Temperatur von 50 °C verlängerte sich die Reaktionszeit deutlich. Eine weitere Verbesserung wurde durch Erhöhung der Konzentration beider Reaktionspartner erreicht, da die Epoxidöffnung im Vergleich zur Cyclisierungsreaktion eine höhere Molekularität besitzt. Nach allen Optimierungsschritten wurde das Produkt letztendlich in 85 % Ausbeute (**112/113**, 88:12) zusammen mit nicht umgesetztem Epoxid (13 %) isoliert.

Für die weitere Synthese wurde die Hydroxyfunktion in eine Abgangsgruppe überführt. Während die Reaktion mit Mesylanhydrid zum Mesylat **115** keinen Umsatz zeigte, war eine Isolierung des Triflat **114** aufgrund seiner Instabilität nicht möglich. Die Umsetzung mit Mesylchlorid lieferte das Mesylat **115** in 75 % Ausbeute (50 mg Maßstab). Im 6 g Maßstab konnte diese Ausbeute allerdings nicht reproduziert werden. Das Mesylat **115** wurde hierbei in nur 51 % Ausbeute erhalten.

Schema 10: Überführung der Hydroxygruppe in eine Abgangsgruppe

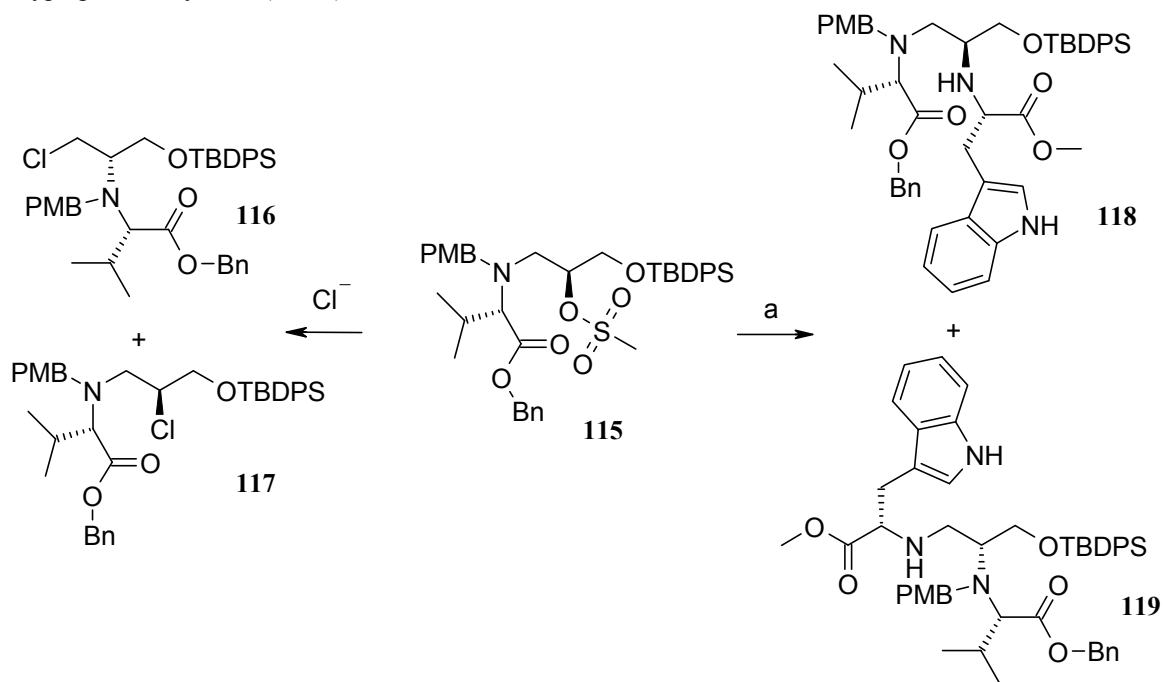


Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Mes-Cl, TEA, DCM, 2 h, RT, 75 %.

Für den nukleophilen Austausch der Mesylatgruppe gegen Tryptophanmethylester ist besonders auf die Verwendung Chlorid-freier Bedingungen zu achten. Durch Umsetzung mit Tryptophanmethylester-Hydrochlorid wurde ein Gemisch der Chloride **116** und **117** erhalten. Das gewünschte Produkt war nur in Spuren nachweisbar (Schema 11).^[201] Chlorid-freie Reaktionsbedingungen führen zu einem Isomergemisch, bestehend aus zwei Verbindungen im Verhältnis 1.5:1. Intensive Auswertung der HMBC-Spektren (Abb. 49, Abb. 50) belegt, dass es sich nicht um Diastereomere, sondern um die beiden Konstitutionsisomere **118** und **119** handelt. Das Amin **119** bildet sich hierbei über die Zwischenstufe des Aziridiniumions **120**, gefolgt von einer nukleophilen Substitution durch Tryptophanmethylester am sterisch weniger gehinderten Kohlenstoffatom. Die Bildung des gewünschten Konstitutionsisomers ist sowohl über die Zwischenstufe des Aziridiniumions gefolgt vom nukleophilen Angriff am stärker abgeschirmten Kohlenstoff (Reaktionspfad A), als auch durch direkte nukleophile Substitution (Reaktionspfad B) möglich (Schema 12). Die beiden möglichen Diastereomere **118** und **122** unterscheiden sich in der Stereochemie an der C₃-Brücke. Die Konfiguration des Stereo-

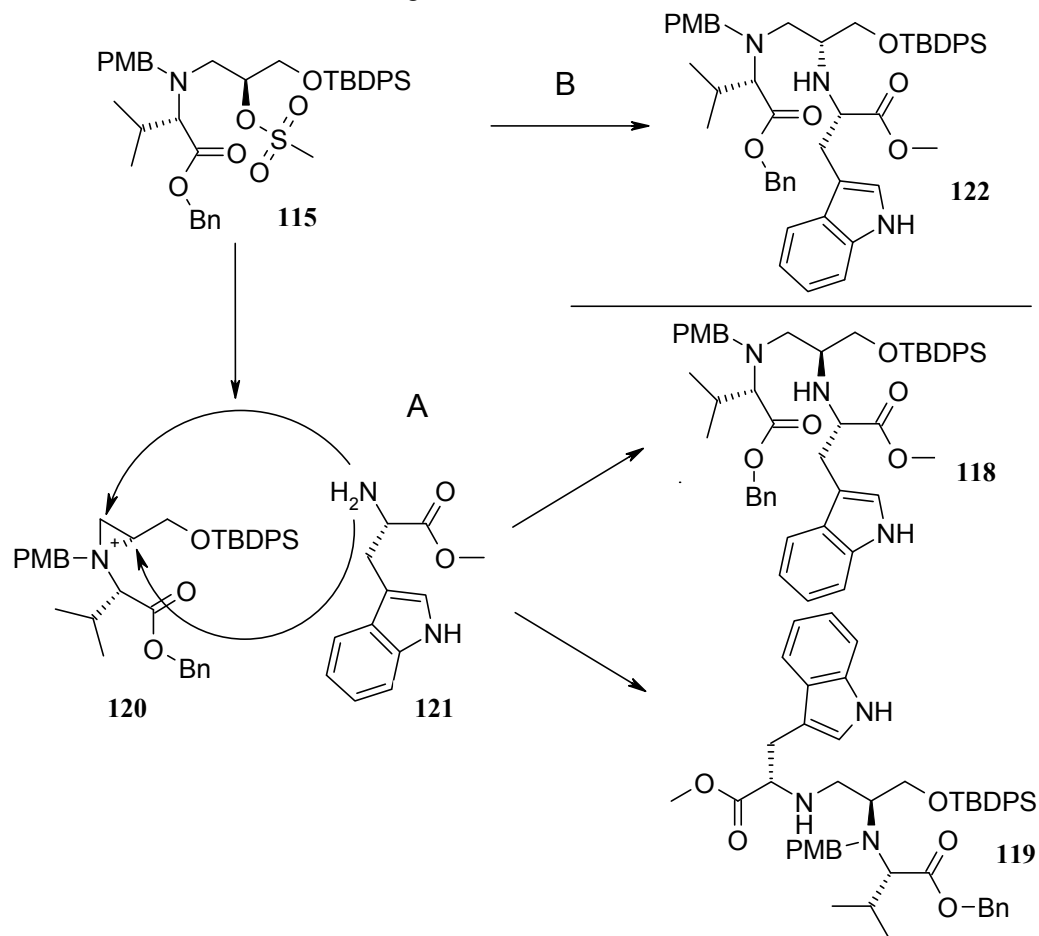
zentrums konnte an dieser Stelle aufgrund der hohen Flexibilität des Systems nicht eindeutig mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Dadurch ist die genaue Aufklärung des Reaktionsmechanismus vorerst nicht möglich. Die NMR-spektroskopische Analyse des Folgeprodukts **130** belegt jedoch eindeutig die *S*-Konfiguration des Stereozentrums und damit die nukleophile Substitution über Reaktionspfad A (Schema 12).

Schema 11: Nukleophile Substitution mit Tryptophanmethylester-Hydrochlorid (links) und Tryptophanmethylester (rechts)



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Trp-OMe, MeCN, 60 °C, 3 d, **118** 26 %, **119** 43 %.

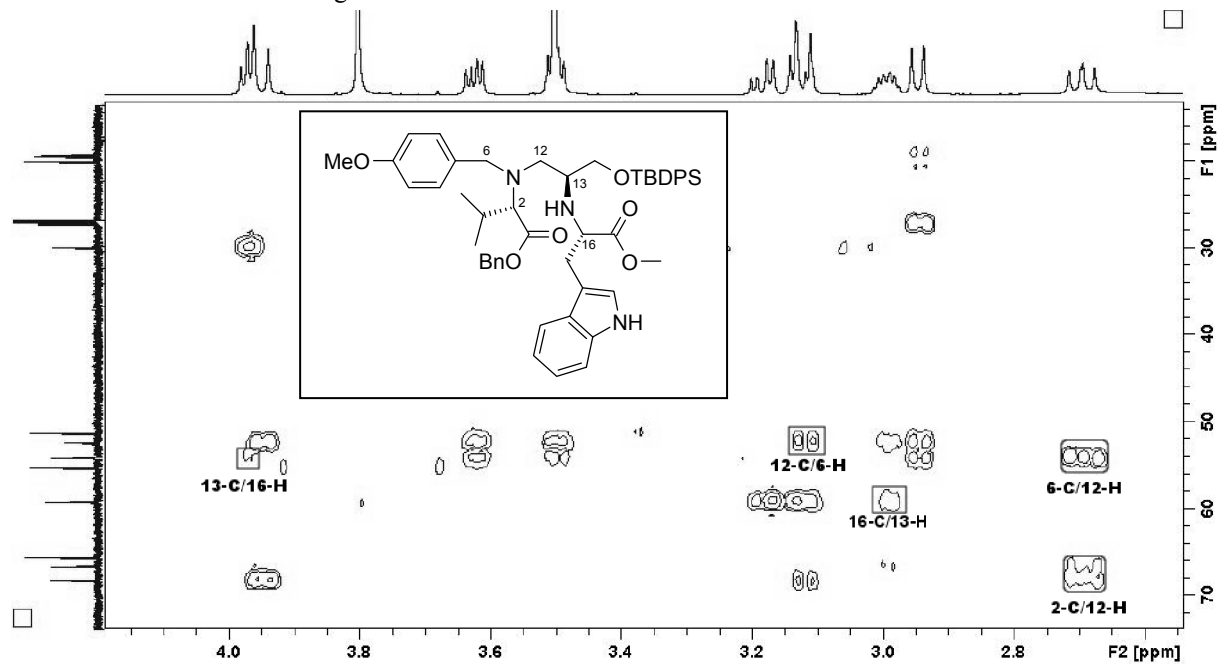
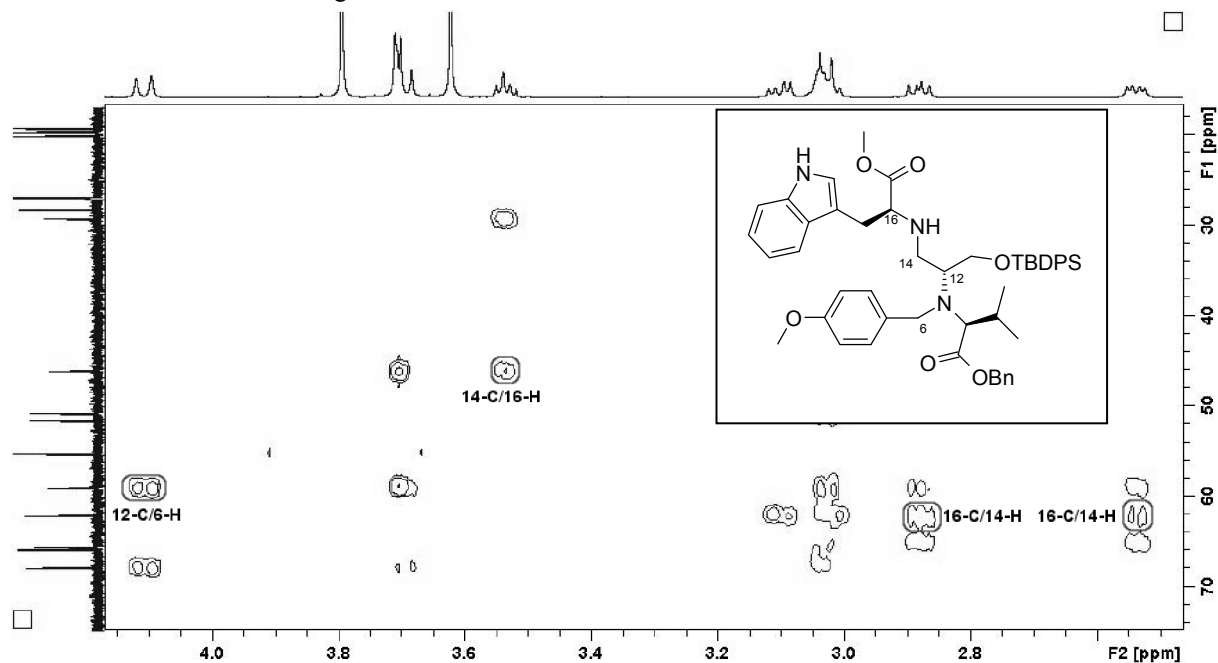
Die bevorzugte Bildung der Aziridinium-Zwischenstufe erklärt ebenfalls die Bildung der beiden chlorierten Produkte **116** und **117**. De Kimpe beschrieb 2010 die Halogenid-induzierte Öffnung von 2-substituierten Aziridiniumsalzen, die die Bildung der chlorierten Produkte **116** und **117** stützt.^[201] Die Bildung des Aziridiniums **120** wird durch den +I-Effekt der PMB-Gruppe begünstigt. Durch einen Wechsel der Schutzgruppe in ein Carbamat lässt sich die Ringbildung vermeiden. Allerdings ist für die Epoxidöffnung ein induktiv aktivierter Valin-Stickstoff notwendig. Eine Umschützung erscheint aufgrund des analog spaltbaren Benzylesters nicht praktikabel.

Schema 12: Mechanismus der Bildung von **118** und **119**

Das Verhältnis der Produkte **118** und **119** zeigte keine signifikante Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel (Tabelle 13). Die Gesamtausbeute ausgehend vom Alkohol **112** wurde verbessert, indem das Mesylat **115** nach kurzer chromatographischer Abtrennung von überschüssigem Mesyl-Chlorid direkt für die nukleophile Substitution eingesetzt wird. Dadurch wurde über beide Synthesestufen in 26 % Ausbeute das Amin **118** und in 40 % Ausbeute das Amin **119** erhalten.

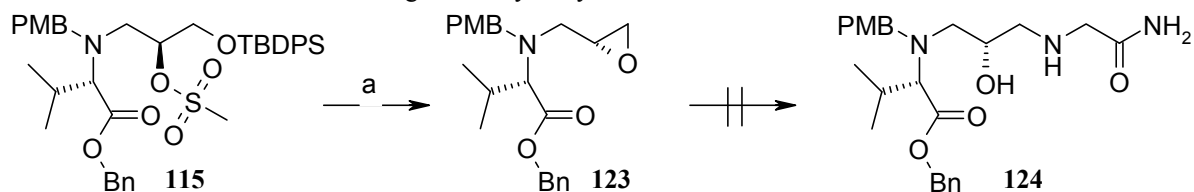
Tabelle 13: Einfluss des Lösungsmittels auf das Produktverhältnis nach 15 h

Lösungsmittel	Umsatz	118/119
Acetonitril	Kein Umsatz	1:1.5
DCM	Vollständig	1:1.3
Toluol	85 %	1:1.7
Ethanol	Vollständig	1:1.4

Abb. 49: Relevante HMBC-Signale des Amins **118**Abb. 50: Relevante HMBC-Signale des Amins **119**

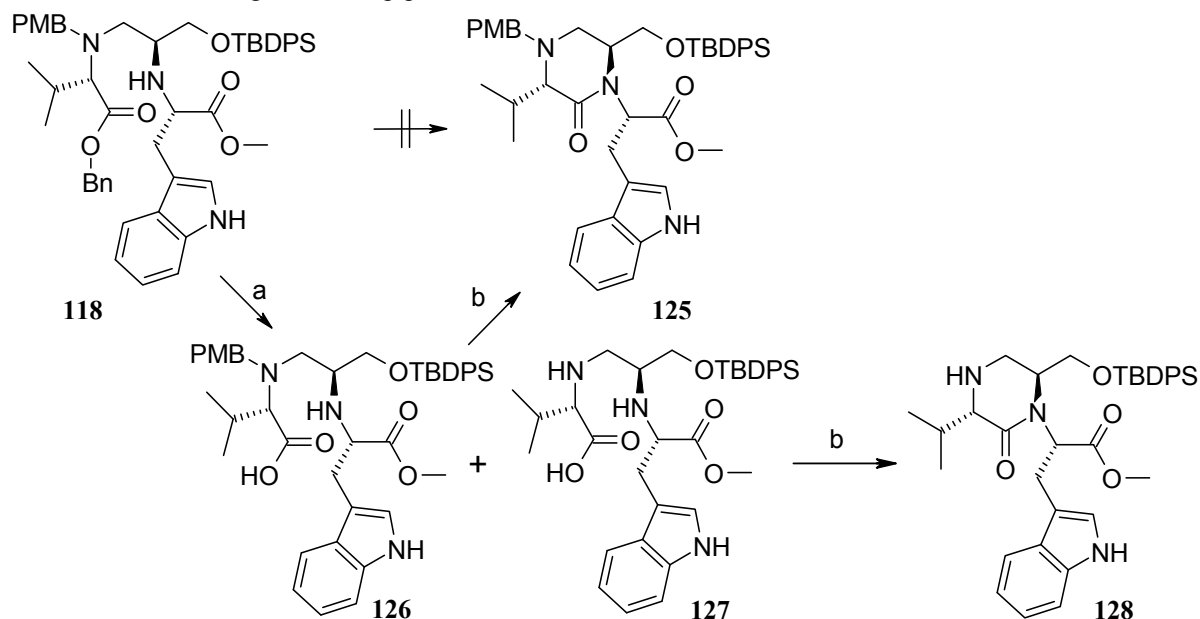
Alternativ wurde versucht, das Glycinamid vor dem Tryptophan in das Molekül einzuführen. Hierfür wurde der Silylether **115** mit TBAF gespalten. Das entstandene Hydroxymesylat cyclisierte zum Epoxid **123**. Die Epoxidöffnung mit Glycinamid unter Magnesiumtriflat-Aktivierung lieferte ein inseparables Produktgemisch, in dem neben dem Produkt **124** und restlichem Edukt **123** noch eine Vielzahl an Nebenprodukten mittels HPLC-MS nachgewiesen wurde.

Schema 13: Versuch der Überführung in das Hydroxyamin **124**



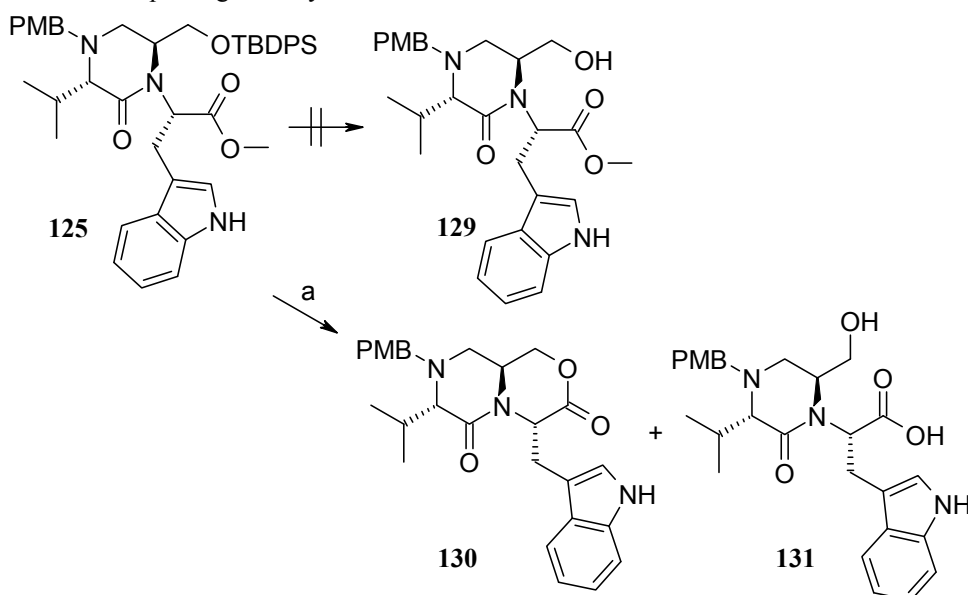
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) TBAF, THF, 18 h, RT, 48 %.

Der nächste Reaktionsschritt umfasst den Aufbau des 2-Ketopiperazins (Ring A). Cyclisierungen von 2-(2-Aminoethylamino)essigsäureester zu 2-Ketopiperazinen sind vielfältig in der Literatur beschrieben und reichen von zweistufigen Reaktionen bestehend aus Esterspaltung mit anschließender Cyclisierung unter Carbonsäureaktivierung,^[202,203] bis hin zu einstufigen Amidbildungsreaktionen unter nukleophiler Spaltung des Esters.^[204-207] Für die Cyclisierung mit Benzylestern sind nur wenige Beispiele bekannt.^[208-210] Die analoge Cyclisierung von **112** zum 2-Ketomorpholin **113** erfolgte sehr schnell und konnte erst nach zeitaufwändiger Reaktionsoptimierung unterbunden werden. Bei der Synthese des Turnmimetikums **85** wurde festgestellt, dass einstufige Cyclisierungen von 2-(2-Aminoethylamino)essigsäurebenzylestern zu 2-Ketopiperazinen prinzipiell schon bei Raumtemperatur möglich sind (siehe S. 92). Eine einstufige Cyclisierung des Peptids **118** zum 2-Ketopiperazin **125** wurde weder durch Erhitzen in Toluol,^[204,207] noch durch Umsetzung mit Natriummethanolat erreicht. Auch Lewis-Säure Aktivierung (Magnesiumtriflat) unter erhöhter Temperatur führte nicht zur Bildung des 2-Ketopiperazins **125**. Säurekatalysierte Cyclisierungen waren aufgrund der Säurelabilität der TBDPS- und PMB-Gruppe nicht möglich.^[209] Deshalb wurde eine zweistufige Reaktionssequenz, bestehend aus Hydrogenolyse des Benzylesters (Pearlman Katalysator) zur Säure **126** gefolgt von einer Cyclisierung unter HATU-Aktivierung, durchgeführt.

Schema 14: Darstellung des Diketopiperazins **125**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, EtOH, RT, 1 h, 92 %; b) HATU, MeCN, RT, 17 h, **125** 59 %, **128** 32 %.

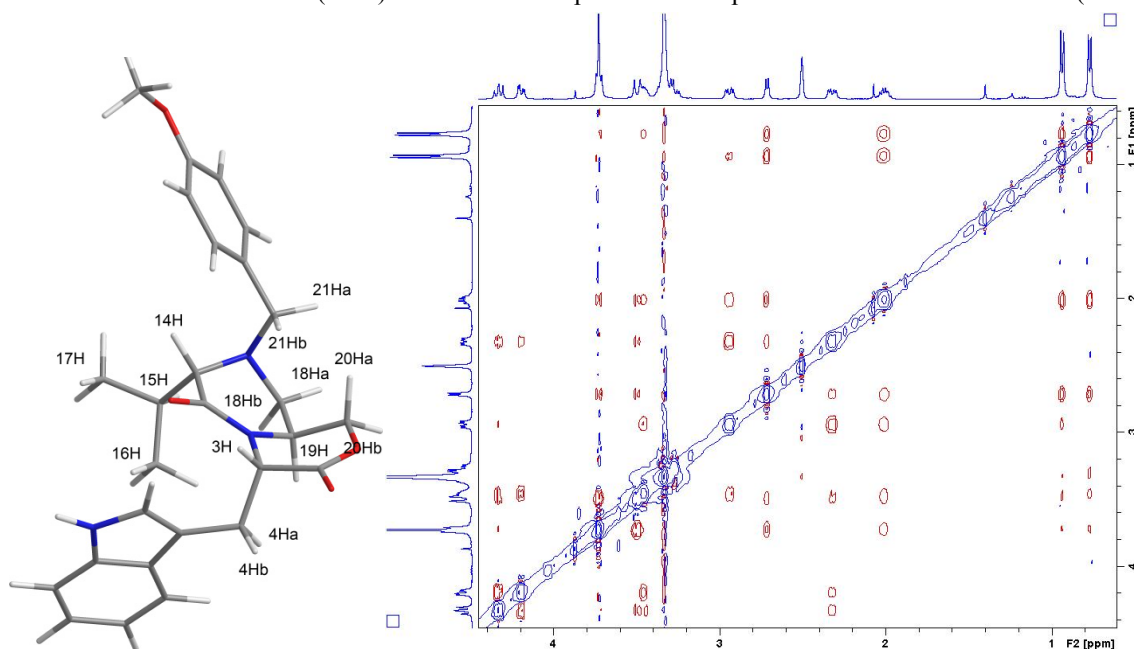
Die PMB-Schutzgruppe erwies sich als partiell labil gegenüber den Bedingungen der Hydrogenolyse. Nach der Cyclisierung wurde ebenfalls das *N*-entschützte Diketopiperazin **128** erhalten. Die Abspaltung des Silylethers unter Fluorideinwirkung führte nicht zum gewünschten Alkohol **129**. Stattdessen wurde nach chromatographischer Reinigung in 28 % Ausbeute das Lacton **130** erhalten. Die geringe Ausbeute wird durch die Bildung der Hydroxysäure **131** verursacht. Diese wurde massenspektrometrisch im Rohprodukt nachgewiesen. Die Isolierung gelang aufgrund ihrer Polarität allerdings nicht.

Schema 15: Spaltung des Silylethers

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) TBAF/THF, THF, 15 h, 0 °C - RT, **130** 28 %.

Die Konfiguration der C₃-Brücke wurde am Lacton **130** durch NMR-Untersuchungen aufgeklärt. Damit verbunden wurde die Epoxidöffnung über die Bildung des Aziridiniumions (Reaktionspfad A, Schema 12) bestätigt. Für die räumliche Strukturaufklärung wurden sowohl die Kopplungskonstanten als auch signifikante NOEs verwendet und ein energieminiertes Konformer simuliert,^[211] das mit den beobachteten NMR-Daten im Einklang steht. Abb. 51 zeigt einen Ausschnitt des NOESY-Spektrums im aliphatischen Bereich. Besonders aussagekräftig ist ein NOE zwischen den Protonen H-2 und H-7 des Indolsystems zum Proton am Stereozentrum (H-19). Dies ist unvereinbar mit einer *R*-Konfiguration und bestätigt die *S*-Konfiguration des Stereozentrums. Diese Aussage ist konsistent mit allen weiteren gefundenen NOEs sowie den Kopplungskonstanten der Protonen innerhalb des C₃-Bausteins.

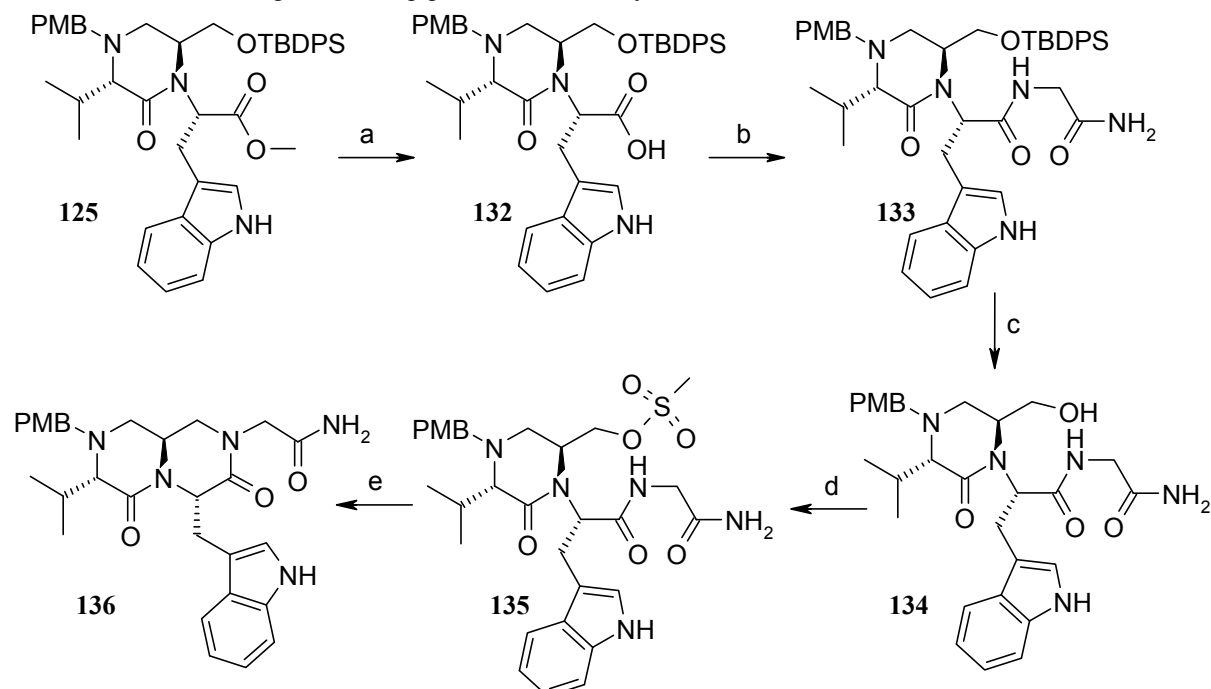
Abb. 51: Ermittelte Struktur (links) sowie NOESY-Spektrum im aliphatischen Bereich des Lactons (rechts) **130**



Aufgrund der unerwarteten Cyclisierung wurde die Syntheseroute überarbeitet. Der Methyl ester **125** wurde mit Lithiumhydroxid gespalten und die freie Säure **132** anschließend unter HATU-Aktivierung an Glycinamid gekuppelt. Die Ausbeute über beide Stufen lag bei 83 %. Aus Löslichkeitsgründen wurde die Esterspaltung in einem Gemisch aus THF/MeOH/H₂O (3:1:1) durchgeführt. Die Nicolaou-Methode (Trimethylzinnhydroxid in 1,2-Dichlorethan) ergab keinen Umsatz.^[212] Die Peptidkupplung mit HATU ergab nach 2 h einen vollständigen Umsatz, während BOP-Cl eine sehr lange Reaktionszeit erforderte. Die Spaltung des Silyl ethers **133** erfolgte mit TBAF in 88 % Ausbeute.^[213] Der zweite Ringschluss wurde durch Mesylierung zum Mesylat **135** und Umsetzung mit Natriumhydrid erreicht. Eine mögliche

Cyclisierung des Mesylats **135** über das endständige Amid zum 9-gliedrigen Cyclus wurde durch NMR-spektroskopische Methoden (H,H-COSY; N,H-HSQC) ausgeschlossen.

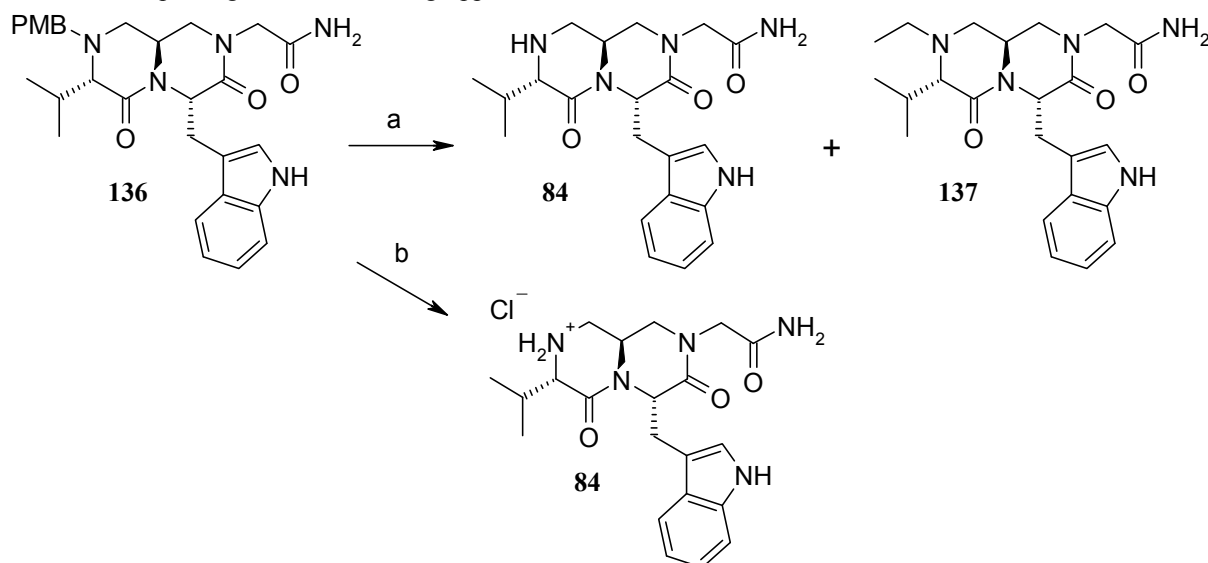
Schema 16: Überführung des 2-Ketopiperazins in den Bicyclus **136**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) LiOH, THF/MeOH/H₂O (3:1:1), 22 h, RT; b) Gly-NH₂*HCl, HATU, DMF, DIPEA, 2 h, RT, 83 % (2 Stufen); c) TBAF, THF, 13 h, 88 %; d) Mes-Cl, TEA, DCM, 5 h; 100 % e) NaH, DMF, 19 h, RT, 56 %.

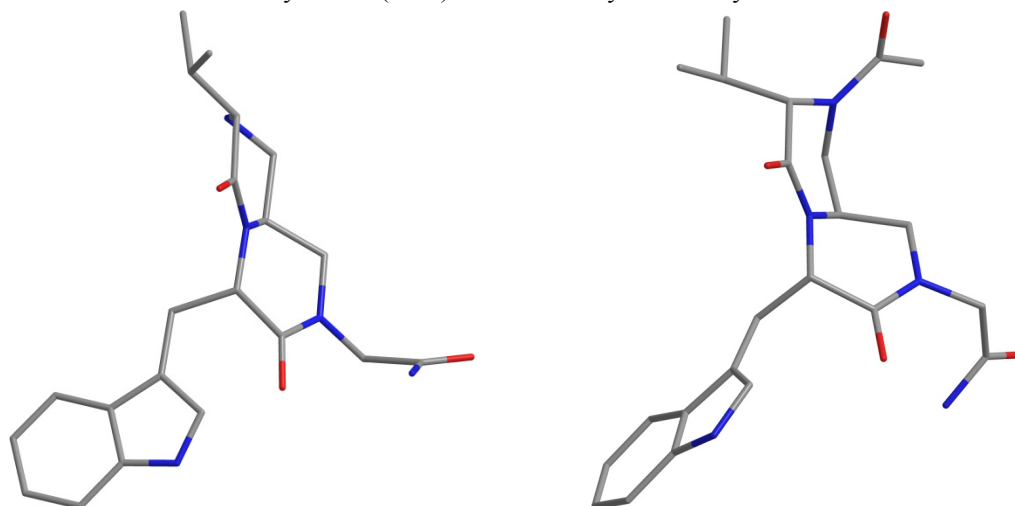
Die Spaltung der PMB-Schutzgruppe sollte mit Cerammoniumnitrat erfolgen.^[214,215] Im HPLC-MS-Spektrum des Rohprodukts war jedoch eine Vielzahl an Nebenprodukten erkennbar. Zur Vermeidung einer zeitintensiven chromatographischen Reinigung wurde versucht, die Empfindlichkeit der PMB-Schutzgruppe gegenüber hydrogenolytischer Spaltung zu nutzen. Die Hydrogenolyse mit Pearlmans-Katalysator in Ethanol zeigte auch nach mehreren Tagen und erhöhtem Wasserstoffdruck (2 Tage/1 bar dann 1 Tag/2 bar und danach 2 Tage/3 bar; RT) keinen vollständigen Umsatz des Edukts. Zusätzlich wurde die Alkylierung des Produkts **84** zum *N*-alkylierten Bicyclus **137** beobachtet. Die Alkylierungsreaktion wurde durch den Wechsel des Lösungsmittels zu Methanol und Zugabe eines Tropfens wässriger Salzsäure unterbunden.

Schema 17: Spaltung der PMB-Schutzgruppe

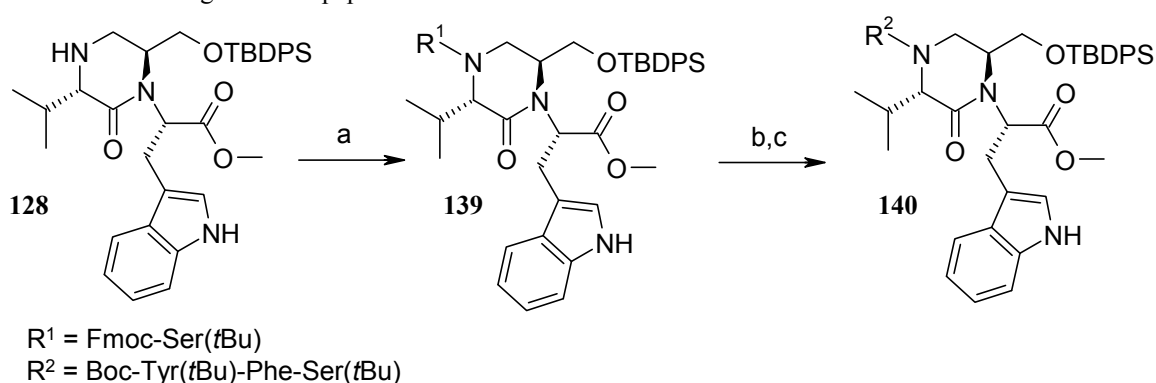


Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, EtOH, 48 h/1 bar, 22.5 h/2 bar, 46 h/3 bar, RT, **84** 29 %, **137** 15 %, **136** 43 %; b) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, HCl_{aq} , 38 h, 5 bar, RT, 96 %.

Die nachfolgende Kupplung an den Amin-Stickstoff des Bicyclus **84** erwies sich als problematisch. Versuche, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH unter HATU-Aktivierung anzuknüpfen, scheiterten ebenso wie die Kupplungsreaktion mit dem Tripeptid **73**. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40 °C war ebenso wenig erfolgreich. Neben dem sterischen Anspruch des Valins und des *t*Bu-geschützten Serins wird eine starke konformative Änderung während der Reaktion angenommen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden sowohl vom Bicyclus **84** als auch von einem acetylierten-Analogon **138** energieminierte Konformere ermittelt.^[211,211] Der Bicyclus **84** bildet eine planare Struktur aus, bei dem der Isopropylrest eine pseudo-äquatoriale Position einnimmt. Sowohl der Valin Stickstoff als auch der Isopropylrest zeigen in die gleiche Raumrichtung. Im acetylierten Cyclus hingegen nehmen sowohl die Isopropyl- als auch die Acetylgruppe eine pseudo-axiale Position ein und verringern dadurch die Van-der-Waals-Abstoßung untereinander. Daraus resultiert eine Verdrillung der 2-Ketopiperazinringe. Infolgedessen benötigen Acylierungen des Cyclus **84** wahrscheinlich hohe Aktivierungsenergien, da **84** eine starke konformative Änderung während der Reaktion erfährt.

Abb. 52: Chem3D-Modell des Bicyclus **84** (links) und eines acetylierten Bicyclus **138**

Die geplante Syntheseroute ist somit nicht durchführbar und macht einen Strategiewechsel erforderlich, um das bicyclische Helicokinin I-Analogon aufzubauen. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen scheinen Acylierungen monocyclischer Vorstufen möglich. Acylierungen von 2-Ketopiperazinen wurden in der Literatur mehrfach beschrieben.^[216-218] Im Falle einer erfolgreichen Peptidknüpfung sollte untersucht werden, ob eine Übertragung der etablierten Cyclisierungsbedingungen auch auf das vollständige Hexapeptid möglich ist.

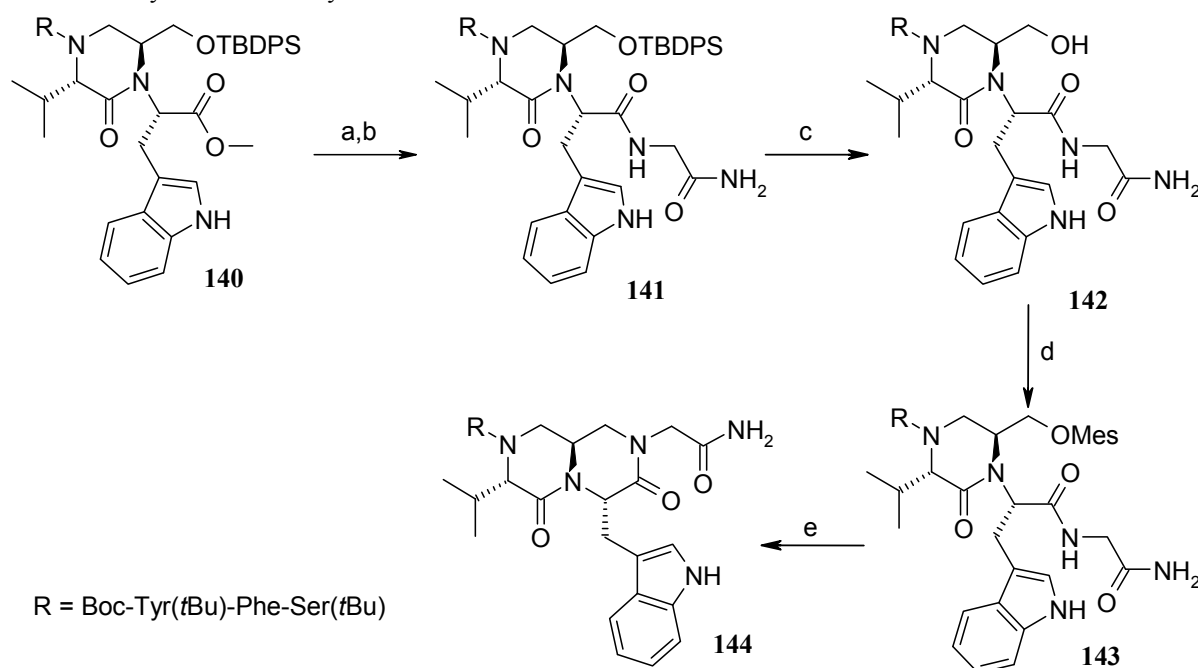
Schema 18: Bildung des Pentapeptidesters **140**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, HATU, DMF, 3 d, 40 °C, 70 %; b) Piperidin, DMF, 2 h, RT, 87 %; c) Boc-Tyr(*t*Bu)-Phe-OH, HATU, DIPEA, DCM, 17.5 h, RT, 89 %.

Die Kupplungsversuche wurden mit dem entschützten 2-Ketopiperazin **128** durchgeführt, da von diesem Nebenprodukt ausreichende Mengen vorhanden waren. In einem ersten Versuch wurde das Amin **128** unter HATU-Aktivierung mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH bei Raumtemperatur umgesetzt. Mittels HPLC-MS wurde zwar ein Umsatz beobachtet, allerdings war das Edukt auch nach 2 Wochen Reaktionszeit nicht vollständig umgesetzt. Eine Temperaturerhöhung auf 40 °C ergab das Peptid **139** nach 3 Tagen in 70 % Ausbeute. Das Peptid **139** wurde *N*-terminal mit Piperidin entschützt und mit dem Dipeptid Boc-Tyr(*t*Bu)-Phe-OH (**239**) in guter

Gesamtausbeute von 77 % über beide Stufen zum Pentapeptid **140** umgesetzt. Die anschließende Reaktionssequenz zum Mesylat **143** erfolgte unter analogen Synthesebedingungen wie zum PMB-geschützten Pyrazinopyrazinon **134**. Durch Spaltung des Methylesters mit Lithiumhydroxid in einem THF/MeOH/Wasser-Gemisch und anschließender Kupplung an Glycinamidhydrochlorid wurde das Hexapeptid **141** epimerisierungsfrei erhalten. Der Silylester wurde in 81 % Ausbeute mit TBAF gespalten. Der resultierende Alkohol **142** wurde mit Mesylchlorid in 85 % Ausbeute zum Mesylat **143** umgesetzt. Die Cyclisierung zum Bicyclus **144** bedurfte jedoch weiterer Optimierung. Ein erster Versuch, die etablierten Bedingungen zu übertragen, führte nicht zum Erfolg. Aus diesem Grund wurden die Reaktionsbedingungen variiert. Ein Testansatz im 10 mg Maßstab (10 Äq. NaH, 40 °C) lieferte nach drei Tagen einen Umsatz von 71 %. Die Durchführung dieser Umsetzung bei höheren Temperaturen (60 °C, 75 °C) führte zur Zersetzung des Substrats. Die Cyclisierung bei 40 °C war im 100 mg Maßstab nicht reproduzierbar, schon nach 24 h wurde Zersetzung des Substrats festgestellt. In einer Patentvorschrift ist die intramolekulare Cyclisierung von Tosylaten mit Amiden zu 2-Ketopiperazinonen in THF beschrieben.^[219] Durch die analoge Umsetzung des Mesylats **143** in THF (4 Äq. NaH, Raumtemperatur) wurde schon innerhalb von 30 Minuten ein exzellenter Umsatz erzielt.

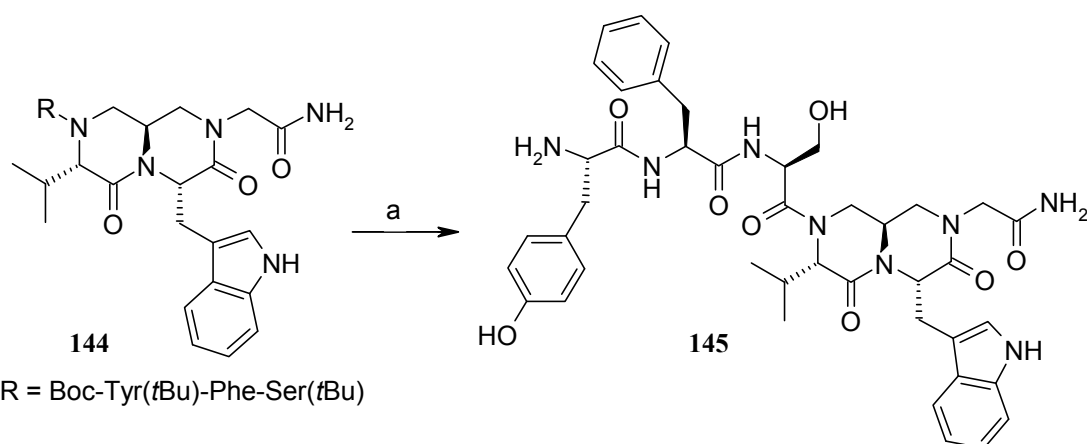
Schema 19: Synthese zum Bicyclus **144**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) LiOH, THF/MeOH/H₂O (3:1:1), 13 h, RT; b) Gly-NH₂*HCl, HATU, DMF, DIPEA, 15 h, RT, 89 % (über beide Stufen); c) TBAF, THF, 19 h, 81 %; d) Mes-Cl, TEA, DCM, 30 min 85 %; e) NaH, THF, 30 min RT, 97 %.

Der letzte Schritt umfasst die komplette Entfernung aller Schutzgruppen mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). Das bicyclische Helicokinin I-Analoga **145** wird in quantitativer Ausbeute als TFA-Salz erhalten. Vor den Konformationsuntersuchungen und dem Rezeptor-Assay wurde das Peptid **145** säulenchromatographisch (EE/EtOH, 0.1 % TEA) in das freie Amin überführt.

Schema 20: Entschützung zum bicyclischen Helicokinin I-Analogen

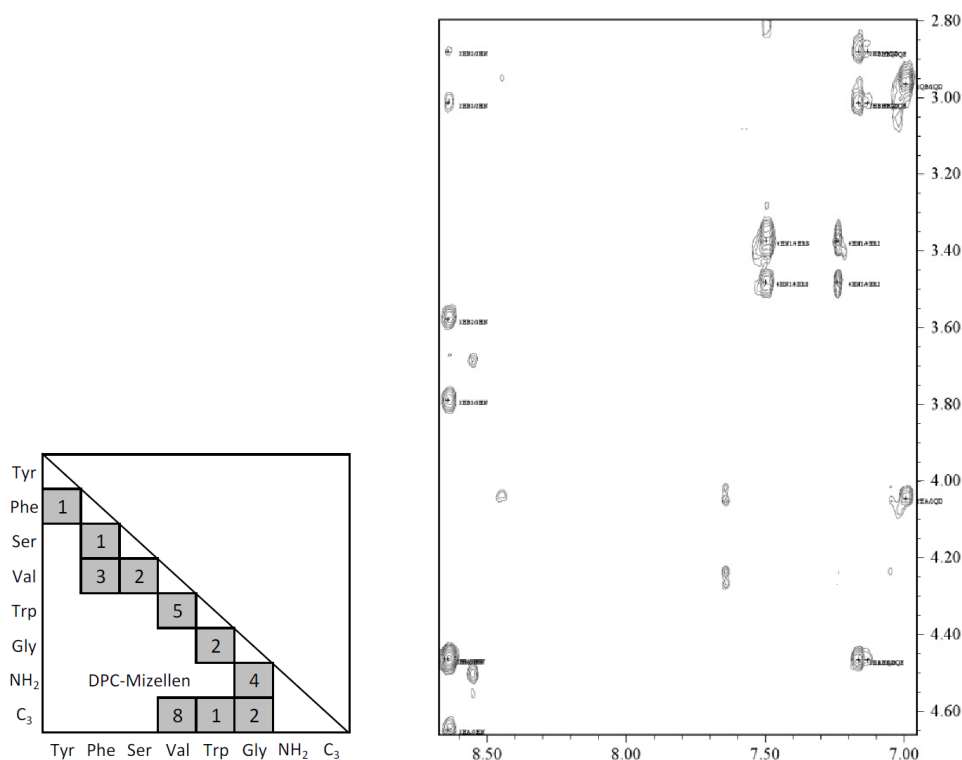


Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5), 30 min, 0 °C - RT, 100 %.

4.2.1.6 Rezeptor-Screening und Konformationsuntersuchung des Helicokinin-Analogen

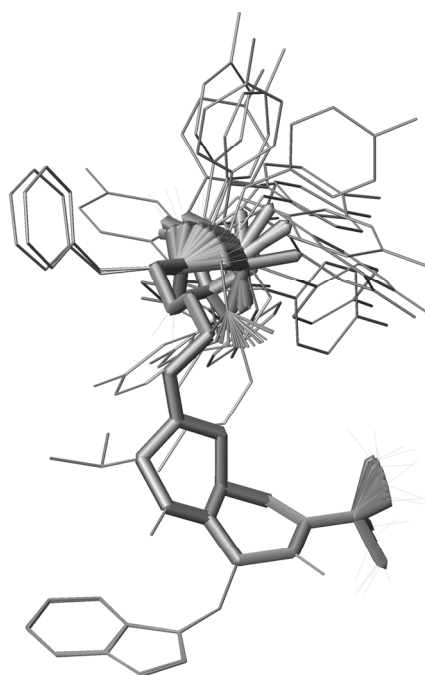
Das bicyclische Helicokinin I-Analogen **145** erwies sich im Rezeptor-Screening als unwirksam. Aufgrund dessen wurden NMR-Untersuchungen an artifiziellen Membranen durchgeführt, um zu überprüfen inwieweit das Analogon **145** die Konformation des membrangebundenen Helicokinin I imitiert. Der Bicyclus **145** liegt in DPC-Mizellen als *cis/trans*-Isomerenmisch (1:6) mit der *trans*-Amidbindung zwischen Serin und dem Valin als Hauptisomer vor (bezogen auf das Peptid-Rückgrat). Mit Ausnahme der ζ -Protonen des Phenylalanins wurden alle stabilen Protonen des Hauptisomers eindeutig zugeordnet. Es konnte eine Vielzahl an NOEs ermittelt werden, vorrangig zwischen der aromatischen Seitenkette des Tryptophans und der aliphatischen Seitenkette des Valins, aber auch NOEs des Aromaten des Phenylalanins und der Valin-Seitenkette. Die Anzahl der NOEs ist vergleichbar mit denen des natürlichen Helicokinins. Strukturrechnungen ergaben die in Abb. 54 gezeigte Konformation, die auf dem ersten Blick eine dem natürlichen Helicokinin I ähnliche Orientierung bezüglich der Phenylalanin- und Tryptophan-Seitenkette vermuten lässt (Vergleich S. 35). Der *N*-Terminus bleibt flexibel, was neben der Strukturrechnung durch die geringe Anzahl gefundener NOEs unterstützt wird. Überlagerung der ermittelten Konformation mit membrangebundenen Helicokinin I zeigt besonders am C-terminalen Glycinamid und der Tryptophan-Seitenkette

Abb. 53: Anzahl der signifikanten interresiduellen NOEs des Helicokinin I-Analogon **145** in DPC-Mizellen (links); NOESY-Spektrum im Bereich der Amide (rechts).



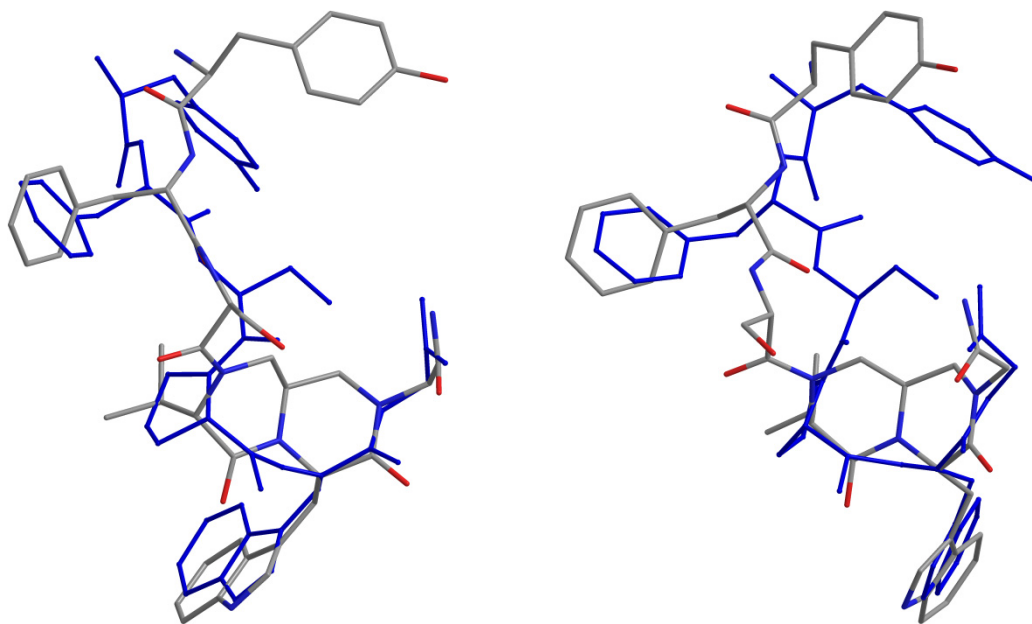
eine sehr gute Übereinstimmung mit dem natürlichen I β -Turn (Abb. 55). Die räumliche Orientierung des Peptidrückgrats der *N*-terminalen Tripeptidkette unterscheidet sich allerdings deutlich vom natürlichen Helicokinin I. Dies ist in der rechten Abbildung gut ersichtlich. Die C_{α} - C_{β} Bindung des Valins besitzt eine leicht unterschiedliche räumliche Orientierung verglichen mit der C_{α} - C_{β} Bindung des Prolins im Helicokinin I. Jedoch erfüllt die Isopropylgruppe einen analogen räumlichen Raumbedarf. Interessanterweise besitzt die aromatische Seitenkette des Phenylalanins die gleiche räumliche Orientierung wie im Helicokinin I. Dadurch besitzen alle durch Struktur-Wirkungs-Untersuchungen ermittelten pharmakophoren Gruppen, die Phenylalanin- und Tryptophanseitenkette sowie das *N*-terminale Glycinamid, eine adäquate Position an der Membran. Als Ursache für die Inaktivität des Peptids **145** kommen daher

Abb. 54: Konformation des mizellgebundenen Turnmimetikums **145**



hauptsächlich andere Faktoren in Frage. Der Einbau von Valin in das Turnmimetikum scheint als Ursache unwahrscheinlich, da die Seitenkette des Prolins für die biologische Wirkung unerheblich ist (S. 23) und die Kinine bekanntermaßen eine Vielzahl von Aminosäuren in dieser Position tolerieren. Um dies jedoch zweifelsfrei als Ursache auszuschließen ist die Synthese des [Val⁴]-Helicokinin I (**146**) und anschließende Untersuchung im Rezeptor-Assay notwendig.

Abb. 55: Überlagerung des Cyclus **145** mit Helicokinin I (blau) gebunden an DPC-Mizellen aus zwei verschiedenen Blickwinkeln



Eine weitere Ursache liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Konformation der *N*-terminalen Tripeptidkette, besonders im Bereich des Serins. Durch die unterschiedliche Orientierung ist es möglich, dass das Peptid nicht mehr in die Bindungstasche des Rezeptors passt. Durch die veränderte Konformation des Peptid-Rückgrat nimmt zusätzlich die *N*-terminale Aminogruppe eine andere räumliche Orientierung ein als im natürlichen Helicokinin I. Die Struktur-Wirkungs-Untersuchungen lieferten Hinweise, dass Tyrosin nicht essenziell für die biologische Wirkung ist. Dagegen belegen nicht veröffentlichte Untersuchungen diverser, von K. Brücher synthetisierter, Substratanaloga des *N*-terminalen Dipeptids Tyr-Phe, dass die *N*-terminale Aminofunktion für eine erfolgreiche Rezeptor-Aktivierung hilfreich ist. Eine konformative Änderung des membrangebunden Neuropeptids Helicokinin I während der Rezeptor-Erkennung kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dieser Konformationswechsel kann gering ausfallen, wie am Beispiel des Bradykinins gezeigt.^[61] Dennoch ist auch eine drastische Änderung der räumlichen Orientierung denkbar, wenn auch weniger wahrscheinlich. Aufgrund der geringen Flexibilität des bicyclischen Systems sind auch geringe

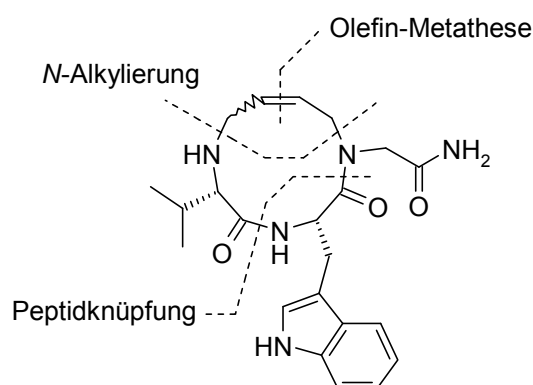
Konformationswechsel im Bereich des β -Turns unmöglich. Darin liegt möglicherweise die Hauptursache für die Inaktivität des Peptids **145** begründet. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint die Synthese der flexibleren, monocyclischen Turnmimetika **85** und **86** attraktiv.

4.2.2 Synthese des 1,4,7-Triazacycloundec-9-en-2,5-dions

4.2.2.1 Retrosynthetische Überlegungen zum Turnmimetikum

Nach retrosynthetischer Betrachtung lässt sich das Molekül durch eine Sequenz bestehend aus Olefin-Metathese, *N*-Alkylierungen und Peptidknüpfungen aufbauen. Die Stereochemie der Seitenketten ist hierbei durch die Verwendung der L-Aminosäuren vorgegeben. Olefinmetathesen sind mittlerweile an peptidischen Systemen etabliert und können durch die Verwendung geeigneter Katalysatoren sogar in protischen Lösungsmitteln wie Wasser durch-

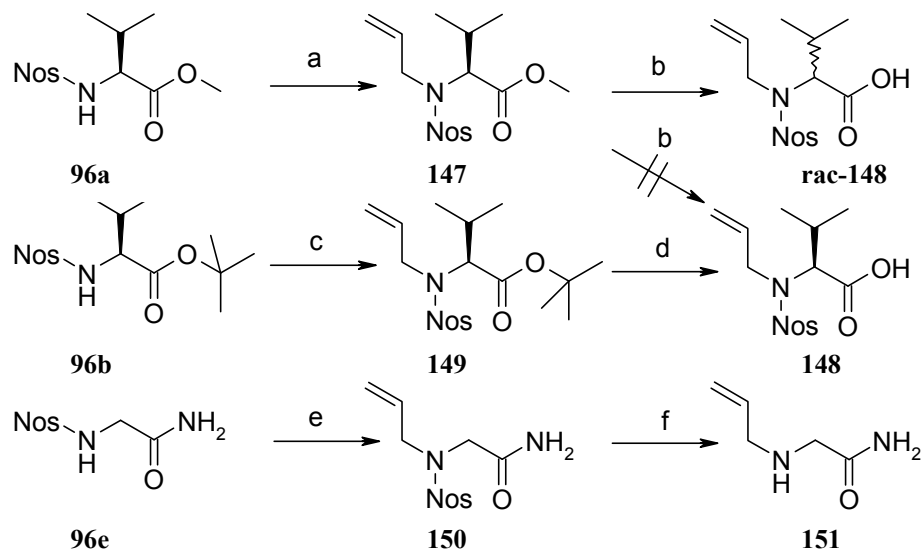
Abb. 56: Retrosynthetische Betrachtung zum Turnmimetikum **86**



geführt werden.^[220-226] Für den Makrocyclus **86** scheint der Aufbau eines linearen Tripeptids aus *N*-terminal geschütztem *N*-Allyl-Valin, Tryptophan und *N*-Allyl-Glycinamid unter Verwendung etablierter Peptidchemie und darauf folgender Cyclisierung mittels einer Olefinmetathese sinnvoll. Die benötigten *N*-Allylaminosäuren sollen hierbei durch *N*-Alkylierung entsprechender Aminosäurederivate dargestellt werden.

4.2.2.2 Synthese der Allyl-Aminosäurebausteine

Zur Darstellung der Allyl-Aminosäurebausteine wurden die Nosyl-Valinester **96a**, **96b** und **96e** mit Allylbromid gemäß den Fukuyama-Alkylierungsbedingungen^[192] zu den Allylaminosäurederivaten **147**, **149** und **150** umgesetzt. Für den Valinbaustein **148** war die Verwendung des *tert*-Butyl-Esters notwendig. Die anfänglich getestete analoge Syntheseroute ausgehend vom kostengünstigeren Valinmethylester scheiterte an der Racemisierung des Stereozentrums während der Esterspaltung, selbst unter milden Bedingungen wie die Verwendung von LiOH in wässriger THF-Lösung.^[227,228] Grund für die Racemisierung unter basischen Bedingungen ist die starke Acidifizierung des α -Protons durch die Nosyl-Gruppe.^[229] Der Versuch der nukleophilen Esterspaltung durch Umsetzung mit Lithiumiodid in Ethylacetat unter Rückfluss brachte keinen zufriedenstellenden Umsatz.^[230,231]

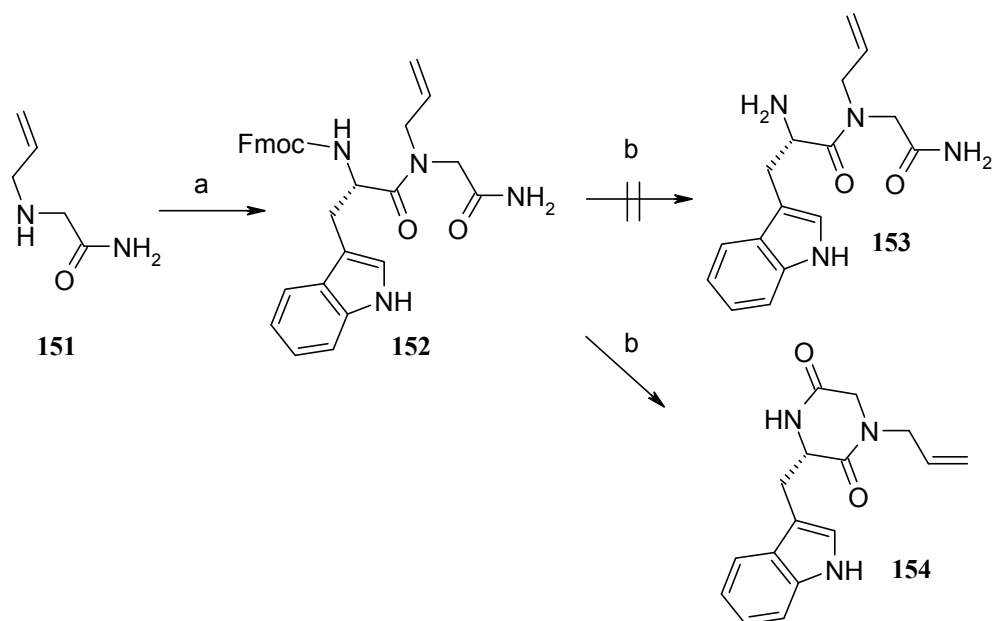
Schema 21: Synthese der benötigten Allyl-Aminosäurederivate

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Allyl-Br, Cs₂CO₃, DMF, 16 h, 97 %; b) 2 M, NaOH, MeOH, 16 h, 0 °C - RT, 99 %; c) Allyl-Br, Cs₂CO₃, DMF, 16 h, 99 % d) TFA, DCM, 0 °C, 3 h, 99 %; e) Allyl-Br, Cs₂CO₃, DMF, 24 h, 67 %; f) PhSH, K₂CO₃, MeCN, 24 h, 89 %.

Bei der Synthese des Glycinbausteins war besonders die Reinigung des Allylglycinamids **151** aufgrund dessen ausgezeichneter Wasserlöslichkeit problematisch. Nach aufwändiger Optimierungsarbeit erwies sich eine Kombination aus Soxhlet-Extraktion und anschließender chromatographischer Reinigung (89 %) als geeignet.

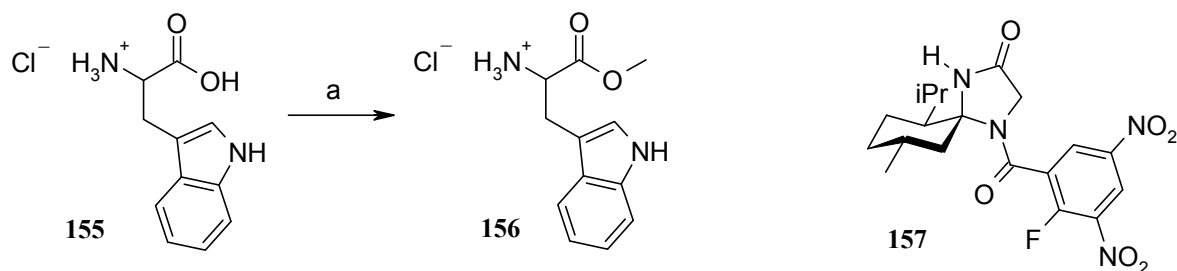
4.2.2.3 Verknüpfung der Allyl-Aminosäurebausteine zum Tripeptid

Allyl-Glycinamid **151** wurde mit Fmoc-Trp-OH in 68 % Ausbeute zum Dipeptid **152** gekuppelt. Bei der Fmoc-Spaltung wurde nicht das freie Amin **153** sondern ausschließlich das Diketopiperazin **154** isoliert. Dieses entsteht durch Angriff des freien Amins auf das C-terminale Amid unter Abspaltung von Ammoniak und wurde bisher nur vereinzelt in der Literatur beschrieben.^[232,233] Aufgrund dieses unerwarteten Ergebnisses kann der standardmäßig in der Peptidchemie verwendete Aufbau des Tripeptids **160** vom C- zum N-Terminus nicht genutzt werden.

Schema 22: Peptidaufbau vom *N*- zum *C*-Terminus

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Fmoc-Trp-OH, HATU, DIPEA, MeCN, RT, 14 h, 68 %; b) Piperidin, DMF, RT, 2 h, 82 %.

Die geänderte Syntheseroute basiert auf einer Synthese vom *N*- zum *C*-Terminus gemäß Schema 24. Die Allyl-Valinsäure **143** wurde in 77 % Ausbeute an Tryptophanmethylester (**156**) gekuppelt, der zuvor aus Tryptophan (**155**) durch Umsetzung mit Thionylchlorid in Methanol hergestellt wurde. Die Enantiomerenreinheit des Tryptophanmethylesters wurde sowohl durch den Drehwert als auch durch HPLC-Analyse nach Derivatisierung mit DNFB-*iso*-MI **157**, einer von Kotthaus^[234] entwickelten chiralen Variante des Sanger-Reagenzes auf Menthonbasis, bestimmt.

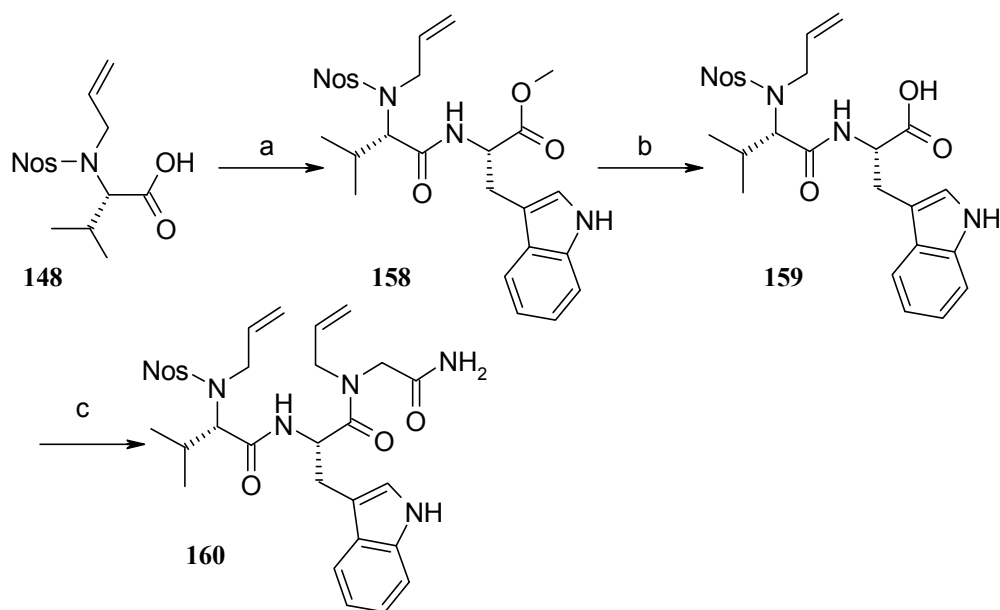
Schema 23: Herstellung von Tryptophanmethylester-Hydrochlorid **156** (links) und DNFB-*iso*-MI **157** (rechts)

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) SOCl₂, MeOH, 24 h, 0 °C - RT, 92 %.

Der Methylester **158** wurde mit Lithiumhydroxid^[235] quantitativ gespalten und anschließend die freie Säure **159** an Allyl-Glycinamid **151** gekuppelt. Bei der Kupplung zu **160** unter PyBOP-Aktivierung wurde die Epimerisierung eines Stereozentrums und damit verbunden die Bildung von zwei Diastereomeren mittels NMR- und HPLC-Analytik festgestellt. Aufgrund der Stabilität des Valin-Stereozentrums unter den vorherigen Peptidkupplungsbedingungen

erscheint die Epimerisierung am α -Kohlenstoff des Tryptophans bei der Kupplung an den sekundären Stickstoff des Allyl-Glycinamids wahrscheinlich.

Schema 24: Aufbau des Tripeptides vom *N*- zum *C*-Terminus



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) **156**, PyBOP, MeCN, DIPEA, 16 h, 77 %; b) LiOH, THF/H₂O (2:1), 3 h, 99 %; c) **151**, BOP-Cl, MeCN, DIPEA, 5 h, RT, 68 %.

Zur Vermeidung der Epimerisierung wurden verschiedene Reaktionsbedingungen überprüft. Als Kupplungsreagenzien wurden sowohl PyBOP als auch die für Kupplung an sekundäre Amine besonders geeigneten Reagenzien HATU/HOAt,^[236] BOP-Cl^[237] und BEP^[238] in DCM und MeCN getestet (Tabelle 14). Die besten Ergebnisse wurden mit BOP-Cl erhalten. Das Edukt war nach einer Reaktionszeit von 1 h ohne Epimerisierung vollständig umgesetzt. Dagegen zeigten PyBOP und HATU einen hohen Grad an Epimerisierung. Ebenfalls epimerisierungsfrei lief die Kupplung mit BEP, allerdings bildete sich hier ein Nebenprodukt mit ähnlicher Polarität wie das Tripeptid **160**.

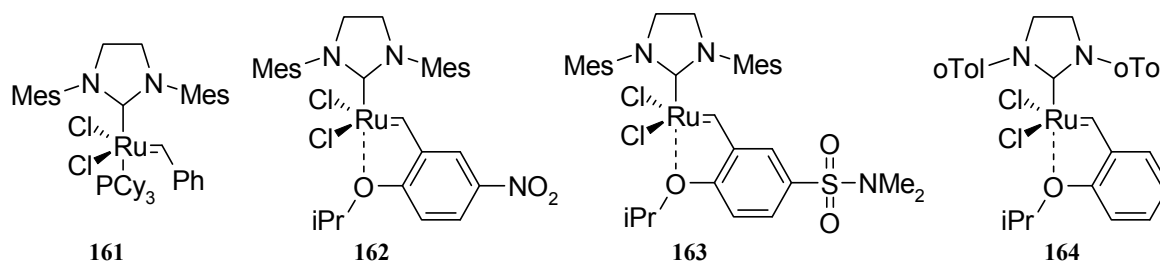
Tabelle 14: Optimierung der Kupplung von **159** an Allyl-Glycinamid **151**

Kupplungsreagenz	Lösungsmittel	HPLC-UV Analyse nach 1 h
BOP-Cl	DCM	keine Epimerisierung, vollst. Umsatz
BOP-Cl	MeCN	keine Epimerisierung, vollst. Umsatz
HATU/HOAt	DCM	Epimerisierung 3:2, kein vollst. Umsatz
HATU/HOAt	MeCN	Epimerisierung 3:2, kein vollst. Umsatz
BEP	DCM	keine Epimerisierung, kein vollst. Umsatz
BEP	MeCN	keine Epimerisierung, nahezu vollst. Umsatz
PyBOP	DCM	Epimerisierung, kaum Umsatz
PyBOP	MeCN	Epimerisierung 1.2:1, kein vollst. Umsatz

4.2.2.4 Ringschlussmetathese zum 11-gliedrigen Makrocyclus

Fujii beschrieb 2007 eine RCM zu cyclischen 11-gliedrigen Pseudodipeptiden ausgehend von Diallylaminen unter Verwendung des Grubbs II-Katalysators.^[239] Während zahlreiche Beispiele für Ringschlussmetathesen zu peptidischen 8- bis 10-gliedrigen^[240-243] und 13- bis 20-gliedrigen Makrocyclen^[244-249] bekannt sind, existieren nur wenige Beispiele für 11- und 12-gliedrige Cyclen.^[239,244] Die Übertragung der Fujii-Bedingungen auf die RCM des Diallylamins **160** lieferte selbst bei 27 mol% (Zugabe des Katalysators in zwei Portionen) und Erhöhung der Reaktionsdauer auf 120 h nur 61 % Ausbeute des Makrocyclus **165**. Basierend auf diesem Ergebnis wurde die Reaktion bezüglich des verwendeten Katalysators unter Beibehaltung der weiteren Reaktionsparameter (Lösungsmittel, Temperatur) optimiert. Die Inaktivierung von Metathese-Katalysatoren durch polare Funktionalitäten wie Ketone, Amide und Ester ist bekannt.^[250-252] Deshalb wurden für die weiteren Arbeiten ausschließlich Katalysatoren vom Hoveyda-Typ verwendet, da diese eine exzellente thermische Stabilität und hohe Toleranz gegenüber Sauerstoff-Funktionalitäten und Feuchtigkeit besitzen.^[253-255]

Abb. 57: Verwendete Metathesekatalysatoren: Grubbs II-Katalysator (**161**), Grela-Katalysator (**162**), Zhan-Katalysator (**163**), Stewart-Grubbs-Katalysator (**164**)



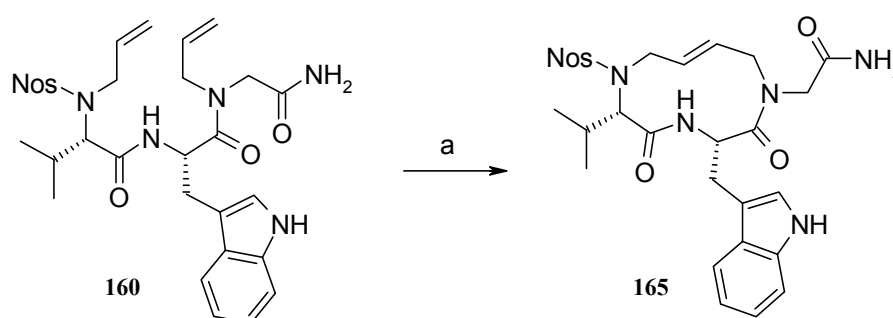
Aufgrund ihrer elektronenziehenden Substituenten in *para*-Position wurden die besonders aktiven Ruthenium-Komplexe **162** (Grela-Katalysator)^[256,257] und **163** (Zhan-Katalysator)^[258] sowie der für sterisch anspruchsvolle Substrate geeignete Stewart-Grubbs-Katalysator^[259,260] (**164**) auf ihre Eignung untersucht (Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnisse der Olefin-Metathese

Katalysator	Katalysatormenge	Temperatur/Reaktionszeit	Ausbeute
161	27 mol%	40 °C / 120 h	61 %
162	10 mol%	40 °C / 48 h	66 %
163	9 mol%	40 °C / 48 h	67 %
164	10 mol%	40 °C / 48 h	Kein Umsatz

Mit dem Stewart-Grubbs-Katalysator konnte auch nach 2 Tagen kein Umsatz erzielt werden. Der Grela-Katalysator und der Zhan-Katalysator hingegen lieferten in guter Ausbeute das Produkt mit nur 10 bzw. 9 mol% Katalysator innerhalb von 48 h und sind damit deutlich effizienter als der Grubbs-II Katalysator. Neben der höheren Effektivität besitzen die Katalysatoren vom Hoveyda-Typ den weiteren Vorteil, dass eine einmalige säulenchromatographische Reinigung des Produktes **165** ausreicht. Durch die gute Chromatographierbarkeit der Hoveyda-Katalysatoren können diese kostenintensiven Ruthenium-Komplexe nach der katalytischen Reaktion wiedergewonnen werden.

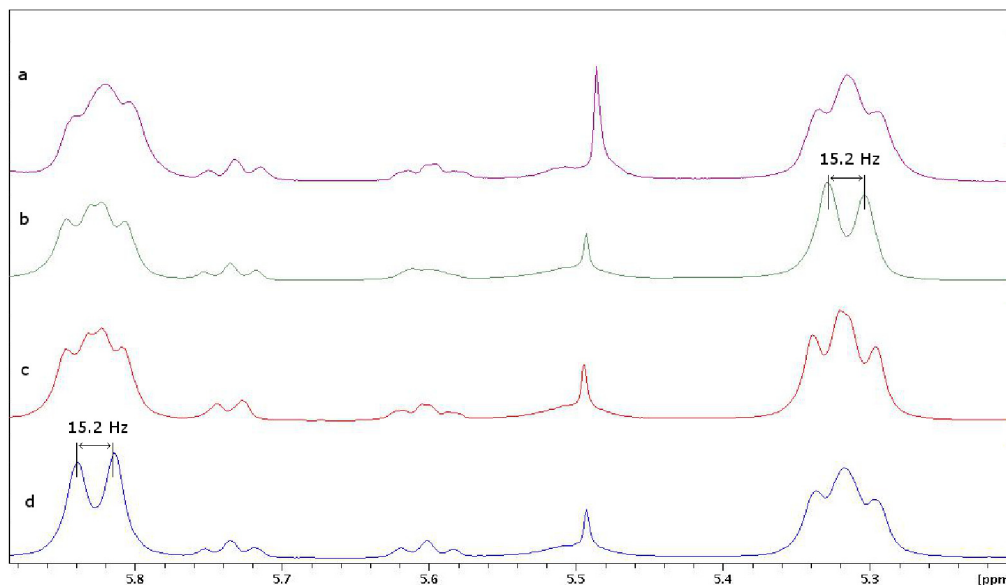
Schema 25: RCM zum 11-gliedrigen Turn-Mimetikum



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) **163**, DCM, 40 °C, 48 h, 67 %.

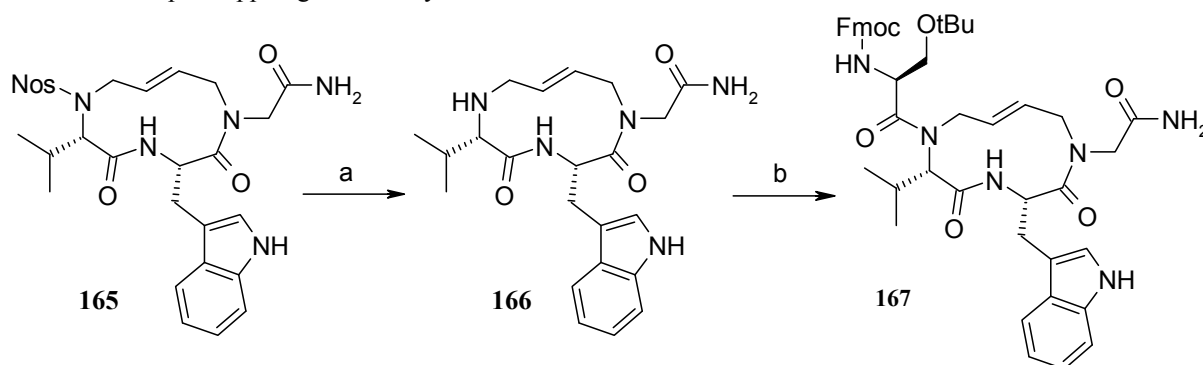
Aufgrund der Komplexität des Kopplungsmusters der olefinischen Protonen (jeweils drei 3J -Kopplungen) war es nicht möglich die relevanten Kopplungskonstanten aus den ^1H -Spektren zu extrahieren. Durch selektive Spin-Entkopplung der diastereotopen Protonen der CH_2 -Gruppen wurden die Signale der olefinischen Protonen vereinfacht und dadurch die Konfiguration der Doppelbindung über Messung der Kopplungskonstante bestimmt (Abb. 58). Die Kopplungskonstante von $J = 15.2$ Hz belegt deutlich die *trans*-Konfiguration der Doppelbindung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Fujii, der bei der RCM ausschließlich die Bildung *E*-konfigurierter 11-gliedriger Makrocyclen fand. Zusätzlich zum Hauptisomer zeigen die NMR-Spektren sowie die HPLC-MS Spektren ein Minderisomer, das jedoch aufgrund unzureichender chromatographischer Trennbarkeit nicht in reiner Form isoliert und identifiziert werden konnte. Möglich wäre sowohl ein Produkt mit *cis*-Doppelbindung oder *cis*-Amid-Bindung zwischen Tryptophan und Valin wie auch ein Produkt mit isomerisierter Doppelbindung.^[261,262] Dimere oder Produkte einer Kreuzkupplung wurden nach massenspektrometrischer Untersuchung der Rohprodukte bei keinem der verwendeten Katalysatoren nachgewiesen.

Abb. 58: (a) ^1H -NMR-Spektrum des Makrocyclus **165** im Olefin-Bereich; (b) selektive Entkopplung des Protons bei 3.5 ppm; (c) selektive Entkopplung des Protons bei 4.30 ppm; (d) selektive Entkopplung der CH_2 -Gruppe bei 4.02 ppm.



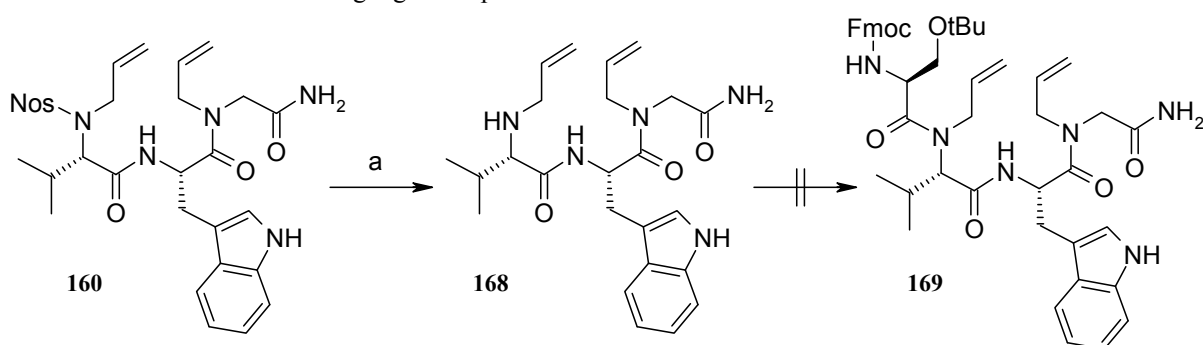
4.2.2.5 Einbau des Turnmimetikums in das Helicokinin I

Für die Integration des Turnmimetikums in das Helicokinin I wurde zunächst die Nosyl-Schutzgruppe gespalten. Die Entschützung mit Thiophenol und Kaliumcarbonat in DMF lieferte auch nach fünf Tagen keinen vollständigen Umsatz zum Amin **166** (42 %). Durch Verwendung von Mercaptoessigsäure und Lithiumhydroxid in DMF wurde nach 3 h Reaktionszeit ein Umsatz von 95 % erzielt. Die darauffolgende Kupplung von Serin an das Peptid **166** erwies sich als ungewöhnlich schwierig. Durch Kupplung mit insgesamt 10 Äq. Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH mit HATU als Kupplungsreagenz wurde nach 3 Tagen ein Gemisch zweier Produkte (55:45) erhalten. Hierbei kann es sich um das Produkt **167** und ein Diastereomer handeln, jedoch ist ebenfalls eine Isomerisierung der Doppelbindung denkbar. Die Separierung beider Verbindungen erforderte einen hohen chromatographischen Aufwand. Aufgrund der geringen Menge an isoliertem Produkt und der *cis/trans*-Isomerie um die tertiäre Amidbindung war eine eindeutige Charakterisierung nicht möglich.

Schema 26: Peptidkupplung an das bicyclische Turnmimetikum

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) HSCH₂COOH, LiOH, DMF, 3 h, RT, 95 %; b) Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, HATU, DMF, 3 d, 40 °C, 29 % (55:45).

Daher wurde versucht, die Metathesereaktion nach dem Aufbau des kompletten Hexapeptids durchzuführen. Die Spaltung der Nosyl-Schutzgruppe des Tripeptids **160** mit Mercaptoethanol und LiOH gelang ohne Schwierigkeiten in 97 % Ausbeute. Allerdings war die anschließende Kupplung von Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH an das Allyltripeptid **168** schwierig. Hierfür wurde eine Vielzahl an Reaktionsbedingungen getestet, die alle keine erfolgreiche Acylierung zeigten. Die durchgeführten Testreaktionen sind in Tabelle 16 zusammengefasst und umfassen die für Kupplungen an sekundäre Amine geeigneten Reagenzien HATU, PyBrOP, BEP und BOP-Cl, die *in situ* Generierung von Säurefluoriden mittels BTFFH, die Kupplung mit EDCI und die Verwendung des Phosphonat-basierten Kupplungsreagenzes T3P.^[263] Selbst die Herstellung eines Aluminiumamids des Tripeptids **168** durch Umsetzung mit Trimethylaluminium und anschließender Kupplung mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-Cl zeigte keinen Erfolg.^[264]

Schema 27: Versuch der Anbringung der Peptidkette an **160** vor der Olefinmetathese

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) HSCH₂CH₂OH, LiOH, DMF, 14 h, RT, 97 %.

Tabelle 16: Versuchsbedingungen der Alkylierung des Tripeptides **168**

Lösungsmittel	Kupplungsreagenz	DIPEA	Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	Temperatur	Zeit
DMF	2 Äq. HATU	4 Äq.	2 Äq.	40 °C	36 h
DMF	5 Äq. PyBrOP	12 Äq.	5 Äq.	RT	36 h
DMF	5 Äq. BEP	12 Äq.	5 Äq.	RT	36 h
DMF	5 Äq. BOP-Cl	12 Äq.	5 Äq.	RT	36 h
DMF	5 Äq. EDCI	12 Äq.	5 Äq.	RT	36 h
DMF	T3P (50 % in DMF)	12 Äq.	5 Äq.	RT	24 h
DMF	10 Äq. BTFFH	40 Äq.	25 Äq.	RT	24 h
THF	5 Äq. HATU	12 Äq.	5 Äq.	RT	24 h
THF	5 Äq. HATU	12 Äq.	5 Äq.	40 °C	24 h
DCM	5 Äq. HATU	12 Äq.	5 Äq.	RT	24 h
Toluol	AlMe ₃	-	1.1 Äq. Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-Cl.	-78 °C - RT	24 h

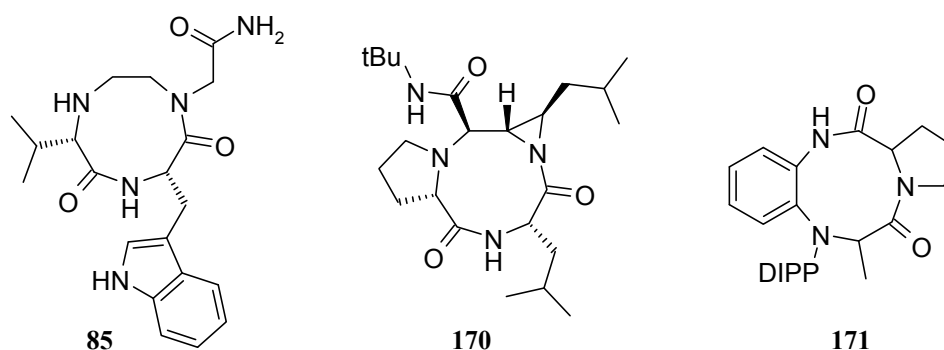
Die Schwierigkeiten der Acylierung von *N*-Allylaminosäuren wurden bereits von Liskamp beschrieben.^[265] Der hohe sterische Anspruch des Valins und des Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH verstärkte die Schwierigkeit der Kupplung an das Tripeptid **168** jedoch noch weiter, so dass kein Produkt **169** erhalten wurde. Als Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen erscheint eine Verringerung des sterischen Anspruchs des Tripeptids **169** sinnvoll. Dies kann durch Austausch des Valins durch Alanin erreicht werden. Die komplette Synthese kann analog der bereits vorgestellten Syntheseroute unter Verwendung der beiden Hoveyda-Grubbs-Katalysatoren **162** und **163** durchgeführt werden. Letzterem ist hierbei aufgrund seiner kommerziellen Verfügbarkeit der Vorzug zu geben.

4.2.3 Synthese des C₂-verbrückten Turnmimetikums

4.2.3.1 Bekannte analoge Verbindungen

Verbindungen mit einem 1,4,7-Triazonan-2,5-dion-Grundgerüst wurden bisher nur vereinzelt in der Literatur beschrieben. Das von Yudin vorgestellte System **170** zeichnet sich durch einen schnellen Aufbau des 9-gliedrigen Makrocyclus aus. Zur Herstellung wurde ein Dipeptid mit Aziridinaldehyd und *tert*-Butylisocyanid umgesetzt. Die Syntheseroute erweist sich jedoch im Hinblick auf die Herstellung maßgeschneiderter Peptidomimetika des Helicokinin I als ungeeignet, da weder das relevante Glycinamid noch das *N*-terminale Ende an den Makrocyclus angebracht werden können.^[266] Das Triazonandion **171** lässt sich schnell aus DIPP-geschützten Dipeptiden und 2-Bromanilin durch Peptidkupplung und anschließender Kupferkatalysierter intramolekularer *N*-Arylierung herstellen. Allerdings sind von dieser Verbindungsklasse keine *N*-alkylierten Verbindungen bekannt. Demzufolge erscheint erneut die Anbringung sowohl des Glycinamid-Restes als auch des fehlenden Tripeptides problematisch.^[267] Sowohl **170** wie auch **171** besitzen aufgrund ihrer starren Funktionalisierung der C₂-Brücke keine gute Übereinstimmung mit dem I β -Turn des Helicokinin I. Eine nicht funktionalisierte C₂-Brücke hingegen sollte eine höhere Flexibilität aufweisen und dadurch auch eine Anpassung an den Rezeptor ermöglichen.

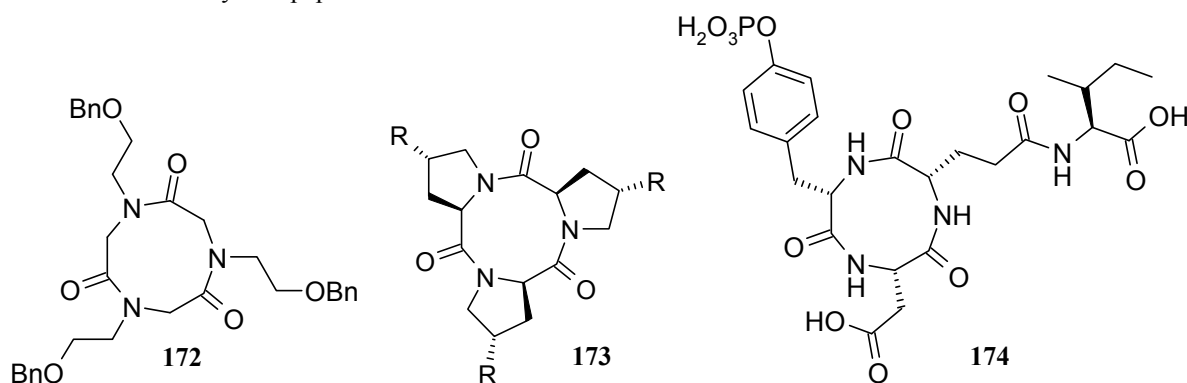
Abb. 59: Geplantes Turnmimetikum **85** und bekannte Strukturen mit 1,4,7-Triazonan-2,5-dion Grundgerüst **170** und **171**



1,4,7-Triazonan-2,5,7-trione, d.h. cyclische Tripeptide wurden mehrfach in der Literatur beschrieben. Es handelt sich jedoch größtenteils um Peptide **172** oder Cycloprolinderivate **173**.^[267,268] Diese sind formal gesehen Cyclisierungsprodukte *N*-alkylierter Tripeptide. Für eine Cyclisierung müssen sich die *C*-terminale Carbonsäure und die *N*-terminale Aminofunktion in direkter räumlicher Nähe zueinander befinden. Aufgrund des höheren Anteils an *all-cis*-Konformeren in Tripeptiden mit zwei tertiären Amidbindungen ist dies in den linearen

Vorstufen von **172** und **173** eher möglich als in nichtalkylierten Tripeptiden.^[269] Die Synthese des unalkylierten Tripeptids **174** erfolgte in mäßigen Ausbeuten unter pseudo-Hochverdünnungsbedingungen an der festen Phase.^[270] Dabei ist die Verknüpfung einer Seitenkettenfunktionalität mit dem Träger-Harz notwendig. Dies ist nicht ohne weiteres mit der Synthese von Helicokinin I Analoga vereinbar. Weiterhin fehlt Cyclotripeptiden allgemein die Möglichkeit der selektiven Funktionalisierung mit einem linearen Tripeptid. Die Anknüpfung des Tripeptids ist jedoch für die Synthese von Peptidomimetika des Helicokinin I eine essenzielle Voraussetzung.

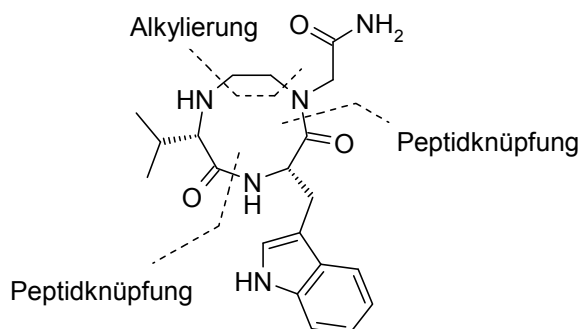
Abb. 60: bekannte Cyclotripeptide



4.2.3.2 Retrosynthetische Überlegungen zum Turnmimetikum

Das C₂-verbrückte Turnmimetikum besitzt ein 1,4,7-Triazonan-2,5-dion-Grundgerüst. Betrachtet man das Molekül retrosynthetisch, so lässt sich die Cyclisierung zum 9-gliedrigen Ringsystem sowohl durch Knüpfungen von Amid-Bindungen als auch durch Alkylierungsreaktionen am Valin-Stickstoff bewerkstelligen. Als Alkylierungsreaktionen kommen

Abb. 61: Sinnvolle retrosynthetische Schnitte des Turnmimetikums **85**



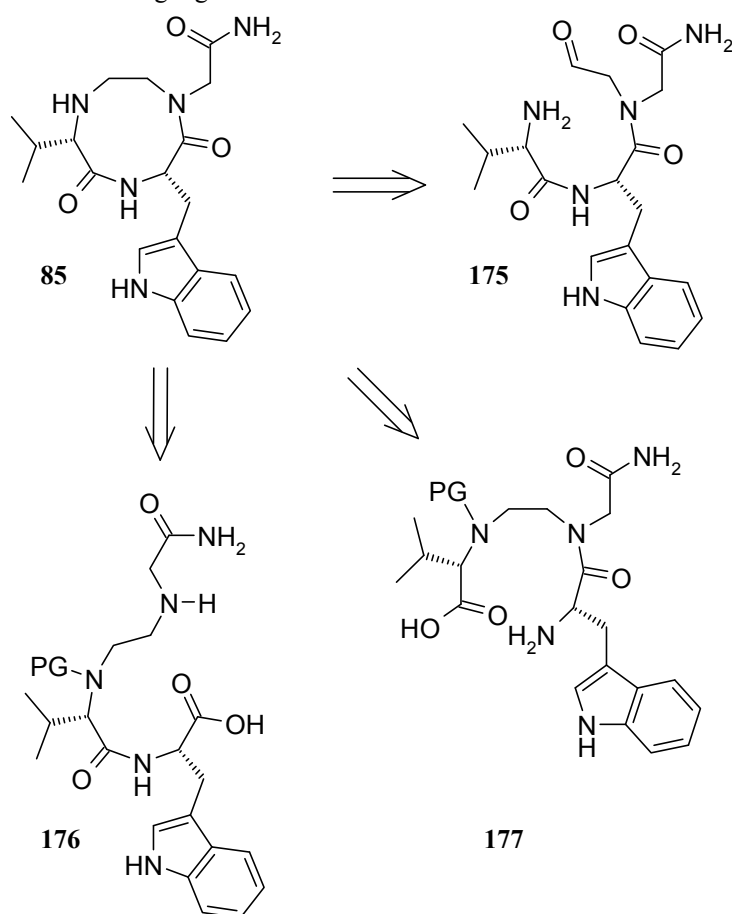
nukleophile Substitutionsreaktionen in Frage, aber auch eine reduktive Aminierung, die den Aminoaldehyd **175** erfordert. Cyclisierungen unter Knüpfung einer Amidbindung sind mittlerweile vielfach an Peptiden etabliert.^[269] Die Intermediate **176** und **177** scheinen somit für die geplante Cyclisierung besser geeignet zu sein als der Aldehyd **175**.

Eine Syntheseroute über die Verbindung **177** ist gegenüber der Cyclisierung von **176** aus zwei Gründen begünstigt:

- Kupplungen an sekundäre Amine weisen oft schlechte Ausbeuten auf und benötigen spezielle Kupplungsreagenzien und
- Cyclisierungen zu 9-gliedrigen peptidischen Makrocyclen sind häufig nur dann in guten Ausbeuten möglich, wenn sich die Peptidenden aufgrund einer *cis/trans*-Isomerie räumlich nahe kommen.

Bei der Wahl einer Carbamat-Schutzgruppe für den Valin-Stickstoff besitzt Verbindung **176** eine tertiäre Carbamatbindung und eine sekundäre, vorwiegend *trans*-konfigurierte Amidbindung, Intermediat **177** hingegen eine tertiäre Carbamatbindung und eine tertiäre Amidbindung. Dadurch sollte die Cyclisierung von **177** begünstigt und eine Syntheseroute über dieses Intermediat erfolgversprechend sein.

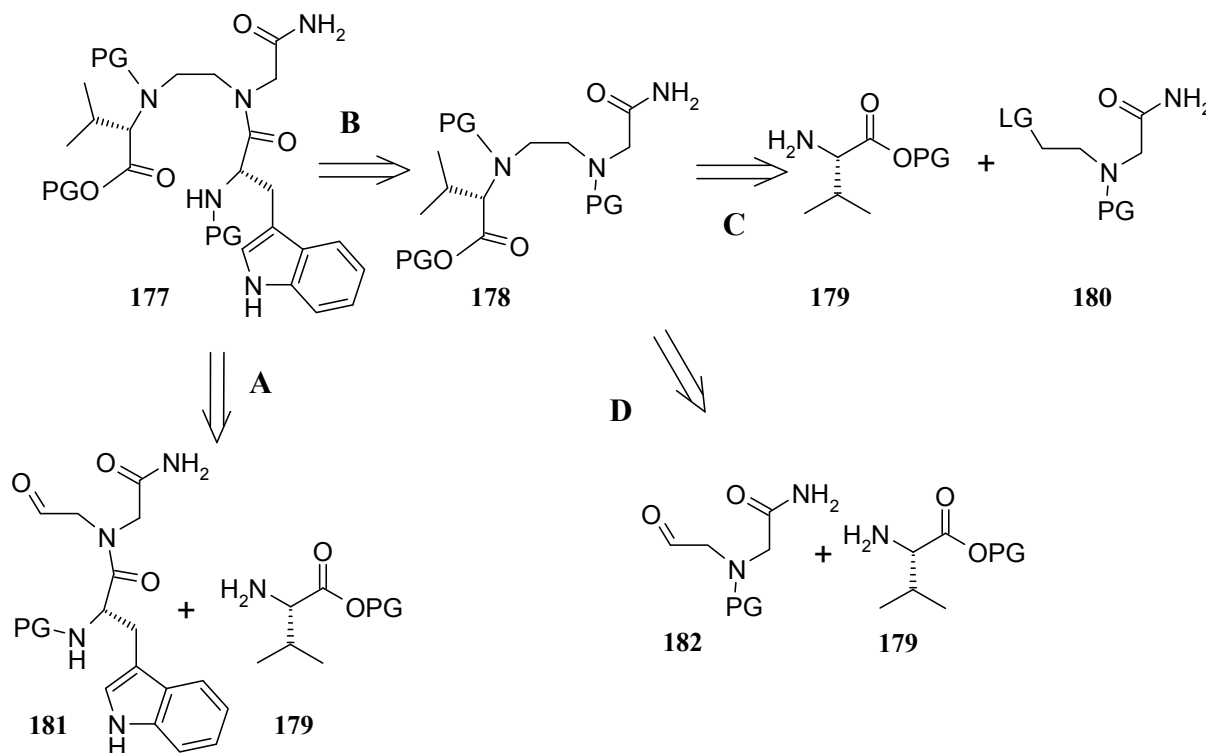
Schema 28: Retrosynthetische Zerlegung von **85**



Bei der retrosynthetischen Zerlegung der Zwischenstufe **177** bieten sich zwei Möglichkeiten an, die sich in der Reihenfolge der Anknüpfung der Aminosäuren Valin und Tryptophan unterscheiden. Die Zerlegung auf Weg A führt zu einem *N*-(2-Oxoethyl)dipeptid **181** und einem

geschützten Valinester **179**. Durch eine reduktive Aminierung können beide Bausteine miteinander verknüpft werden. Weg B setzt auf die Anknüpfung von Tryptophan nach dem Einbau des Valinesters. Dadurch wird die Synthese auf den Baustein **178** zurückgeführt. Das Peptid **178** lässt sich entweder durch reduktive Aminierung (Weg D) oder einer nukleophilen Substitutionsreaktion (Weg C) aufbauen. Wie aus dem Retrosyntheschema ersichtlich, ist die Anknüpfung des Tryptophans vor der reduktiven Aminierung (Weg A) unter dem Gesichtspunkt der Schutzgruppenökonomie sinnvoll. Dadurch kann auf eine intermediäre Schützung des Glycin-Stickstoffs verzichtet werden.

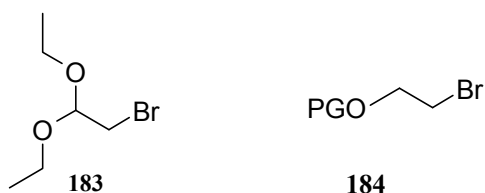
Schema 29: Retrosynthetische Zerlegung der Verbindung **177**



Von zentraler Bedeutung für die Synthese von **85** ist die Wahl des C₂-Bausteins. Hierfür kommen asymmetrisch substituierte 1,2-Ethylenderivate in Frage, in denen ein Substituent direkt nukleophil mit dem Glycin-Stickstoff substituiert werden kann. Die zweite funktionelle Gruppe sollte nach einer möglichst kurzen Reaktionssequenz ebenfalls in eine Abgangsgruppe überführbar sein. 2-Bromacetaldehyddiethylacetal (**183**) erfüllt beide Voraussetzungen. Das Acetal lässt sich unter milden Bedingungen schnell in einen Aldehyd überführen und dieser kann dann mittels reduktiver Aminierung weiter funktionalisiert werden. Hydroxygeschützte 2-Bromethanol-Derivate **184** kommen ebenfalls in Frage, da sie nach Entschützung schnell durch eine Oxidation in einen Aldehyd überführbar sind. Diese können durch eine reduktive Aminierung weiter funktionalisiert werden. Weiterhin lassen sich 2-Hydroxyethanamine in Sulfonate überführen, die durch eine nukleophile Substitution weiter

funktionalisierbar sind. Aufgrund der kleineren Anzahl synthetischer Schritte wurde das kommerziell erhältliche Acetal **183** als C₂-Baustein gewählt.

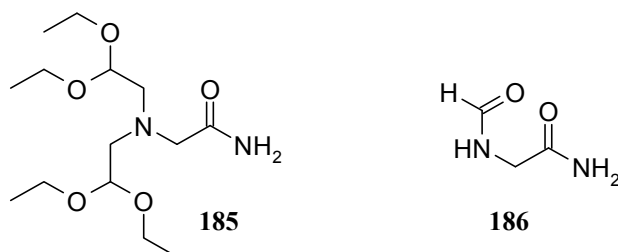
Abb. 62: Geeignete C₂-Bausteine für die geplante Synthese



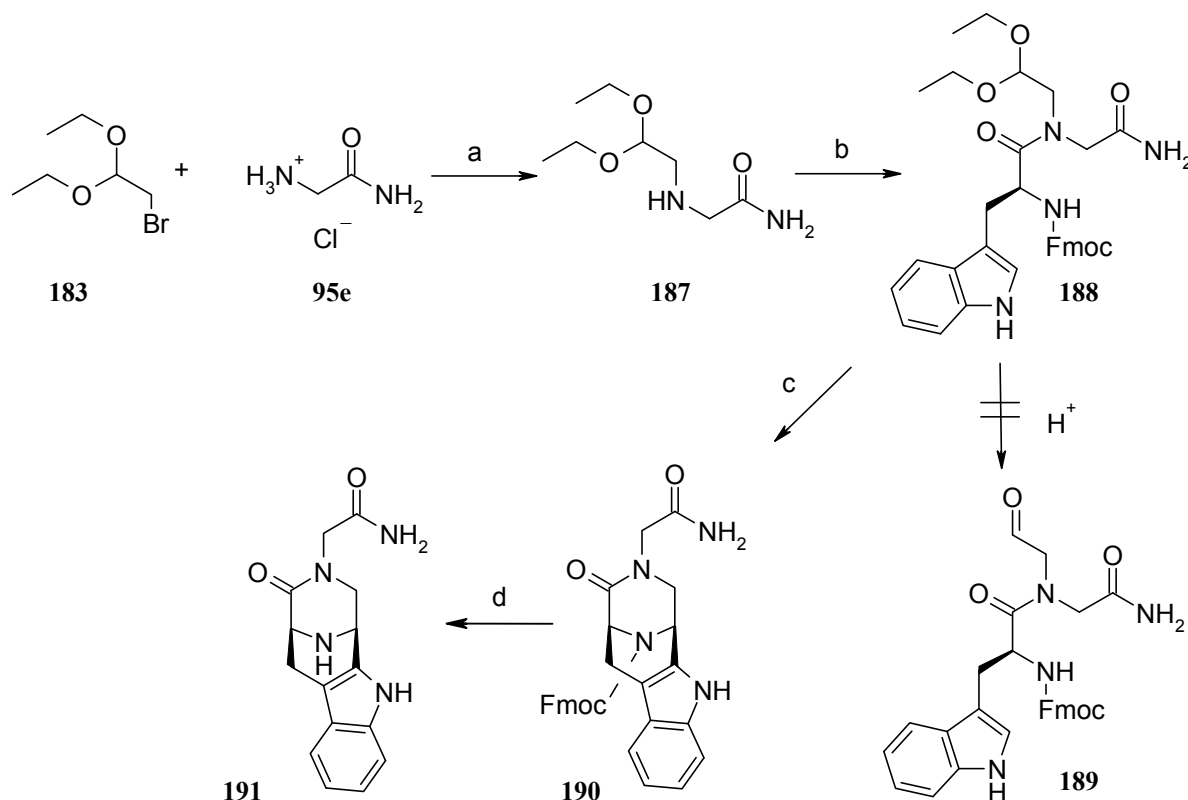
4.2.3.3 Synthese mit Bromacetaldehyddiethylacetal als C₂-Baustein

Der Aufbau des Makrocyclus **85** wurde ausgehend von Glycinamid **95e** und Bromacetaldehyddiethylacetal (**183**) untersucht. Die Alkylierung erfolgte mit Cäsiumcarbonat in Acetonitril. DMF konnte, anders als in der von Nishida^[271] beschriebenen Alkylierung von Glycinmethylester, nicht als Lösungsmittel verwendet werden, da eine Formyl-Übertragung auf den Stickstoff des Glycinamids beobachtet wurde. Das *N*-Formylglycinamid (**186**) wurde NMR-spektroskopisch nachgewiesen und durch Vergleich mit Literaturspektren identifiziert.^[272]

Abb. 63: Nebenprodukte bei der Herstellung des Acetals

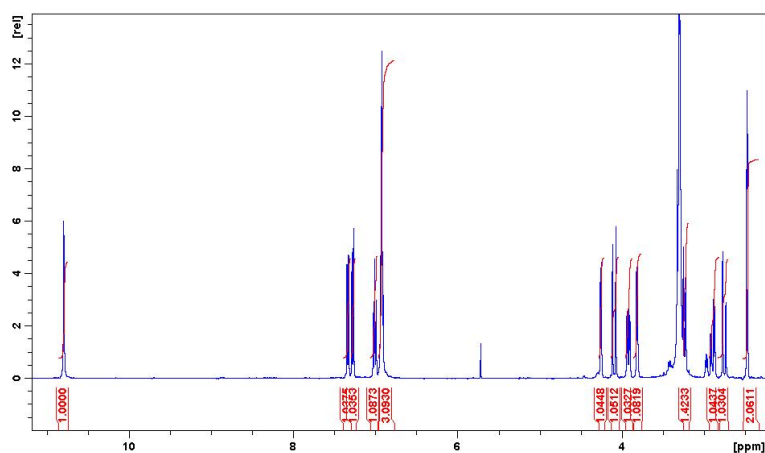


Ein weiteres präparatives Problem bestand in der sehr guten Wasserlöslichkeit des Produkts. Durch flüssig/flüssig-Extraktion konnte nur eine geringe Menge des Glycin-Derivats **187** isoliert werden. Erfolgreich war eine Kombination aus Soxhlet-Extraktion und säulenchromatographischer Trennung des Produkts. Dadurch wurde in 43 % Ausbeute das Monoalkylierungsprodukt **187** und in 4 % Ausbeute das Bisalkylierungsprodukt **185** erhalten. Im Hinblick auf die beschriebene Literatursausbeute von 55 % für das Methylesteranalogon und in Anbetracht der präparativen Schwierigkeiten während der Aufarbeitung ist diese Ausbeute als zufriedenstellend anzusehen.

Schema 30: Erster Syntheseversuch des C₂-verbrückten Turnmimetikums

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) NaHCO_3 , MeCN, 82 °C, 43 h, 43 %; b) Fmoc-Trp-OH, PyBOP, DIPEA, DCM, 72 h, RT, 71 %; c) 1 M HCl, MeCN, 3 h, RT, 71 %; d) Piperidin, DCM, 15 h, RT, 74 %.

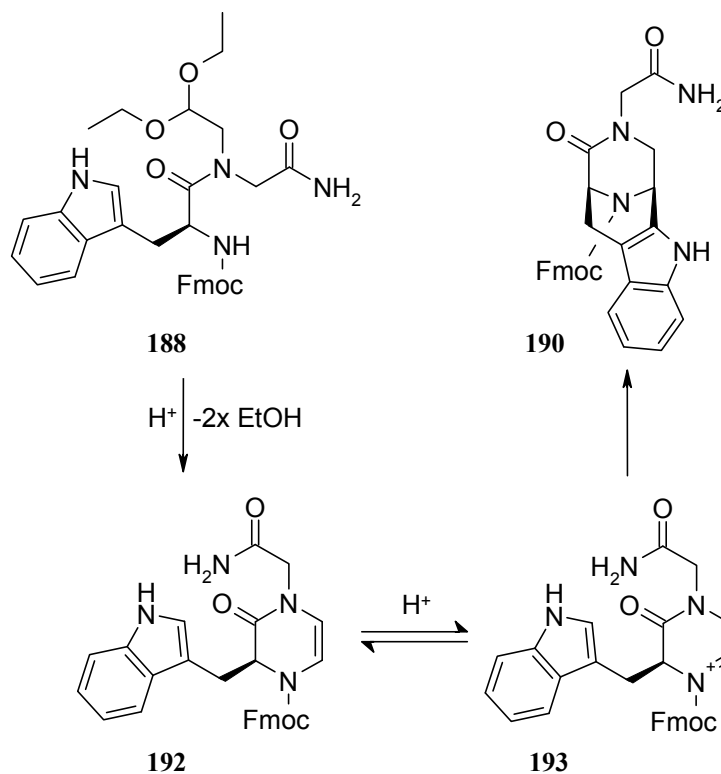
Die Anknüpfung von Fmoc-Trp-OH an das Amin **187** zum Dipeptidbaustein **188** gelang mit PyBOP als Kupplungsreagenz in 71 % Ausbeute. Die anschließende Acetalspaltung unter verschiedenen aziden Bedingungen ergab nicht den gewünschten Aldehyd **189**, sondern führte zum 3,9-Diazabicyclo[3.3.1]non-6-en-2-on **190** in einer Ausbeute von 71 %. Die Struktur **190** wurde durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analysen bestätigt. Aufgrund der *cis/trans*-Isomerie um die Carbamatbindung waren im NMR-Spektrum zwei Signalsätze vorhanden. Für die

Abb. 64: ¹H-NMR-Spektrum des Cyclus **191**

zweifelsfreie Identifizierung des Cyclisierungsprodukts wurde die Fmoc-Schutzgruppe gespalten und das Produkt **191** mittels NMR analysiert (Abb. 64). Die Darstellung von 3,9-Diazabicyclo[3.3.1]non-6-en-2-on-Systemen ist ausgehend von

acetalgeschützten Dipeptidaldehyden für analoge Systeme bekannt.^[273-275] Die Bildung erfolgt laut Opatz unter säurekatalysierter Ethanolabspaltung über die Zwischenstufe des Fmoc-geschützten Dihydropyrazins **192**. Dieses wird zum cyclischen Acyliminiumion **193** protoniert und greift die 2-Position des Indolringes elektrophil an.

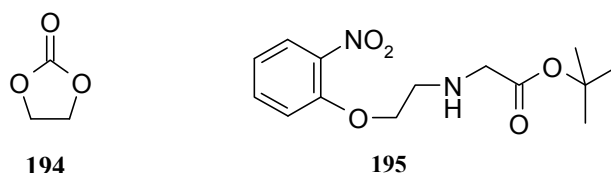
Schema 31: Mechanismus der Bildung des Acyliminiumions.



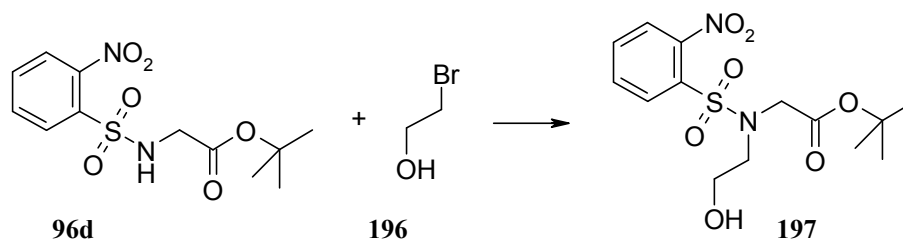
Der Cyclus **190** ist als konformativ eingeschränktes Mimetikum für das C-terminale Dipeptid Trp-Gly-NH₂ interessant, da es in nur drei Stufen aus kommerziell erhältlichen Ausgangsverbindungen hergestellt werden kann.

4.2.3.4 Syntheseroute mit 2-Bromethanol als C₂-Baustein

Aufgrund der unerwarteten Cyclisierungsreaktion scheint eine Anknüpfung von Tryptophan nach der reduktiven Aminierung und damit verbunden eine intermediäre Schützung des Glycin-Stickstoffs unvermeidlich zu sein. Da Dipeptidamide im Basischen unter Ammoniakabspaltung leicht Diketopiperazine bilden (Schema 22), wurde Glycin nicht als Amid sondern als *tert*-Butylester eingesetzt. Der *tert*-Butylester kann anschließend über den Methylester in das amidierte Peptid überführt werden. Eine Schlüsselverbindung war hierbei der Fmoc-geschützte Aminoalkohol **201**. Analog zu den erfolgreichen Allylierungen von Nosylaminen wurde die Fukuyama-Alkylierung der Nosyl-Aminosäure **96d** untersucht. Durch die Verwendung von ungeschütztem Bromethanol schien eine intermediäre Schützung der Hydroxyfunktion überflüssig.

Abb. 65: Entstandene Nebenprodukte: Dioxolan **194** und Phenoylether **195**

Die Alkylierung mit 2-Bromethanol unter den für die Allylierung etablierten Reaktionsbedingungen zeigte erhebliche Mengen des Dioxolanons **194** als nicht abtrennbares Nebenprodukt. Die Gesamtausbeute belief sich bei dieser Reaktion auf unter 60 %. Ein Überschuss an Base führte zu einer vermehrten Bildung von Nebenprodukten, von denen hauptsächlich der Phenoylether **195** zu nennen ist. Dieser entsteht durch intramolekulare Spaltung der Nosyl-Gruppe. Der Wechsel auf andere Basen wie Natriumhydrid (1.1 Äq., 24 % Ausbeute) bzw. DBU (1.1 Äq., 34 % Ausbeute) führte ebenfalls nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Hierbei wurden jedoch 62 % (NaH) bzw. 30 % (DBU) Edukt **96d** reisoliert.

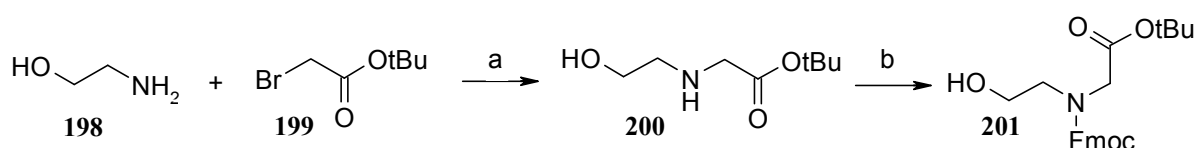
Schema 32: Optimierung der Alkylierung des Sulfonamids **96d** mit Bromethanol (**196**)

Eine Erhöhung der Menge an DBU von 1 Äq. auf 1.5 Äq. ergab einen geringfügig höheren Umsatz, weitere Base führte allerdings zu einer verringerten Ausbeute. Dies liegt vermutlich daran, dass überschüssige Base die intramolekulare Reaktion zum Phenoylether beschleunigt. Der Einfluss der Bromethanol-Menge wurde ebenfalls untersucht. Der Umsatz mit nur einem Äquivalent Bromethanol führte zur vermehrten Bildung des Phenoylethers **195**. Dies unterstützt die Hypothese einer intramolekularen Abspaltung des Nosyl-Restes bei einem vorhandenen Überschuss an Base. Eine Erhöhung der Bromethanol-Menge auf vier Äquivalente zeigte zwar eine deutliche Steigerung des Umsatzes, jedoch lagen die Ergebnisse immer noch in einem unbefriedigenden Bereich. Die Reaktionen mit Lithiumdimethylamid sowie Natriumhydrid brachten ebenfalls keine entscheidenden Verbesserungen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Optimierung der Alkylierung des Nosylamins **96d**

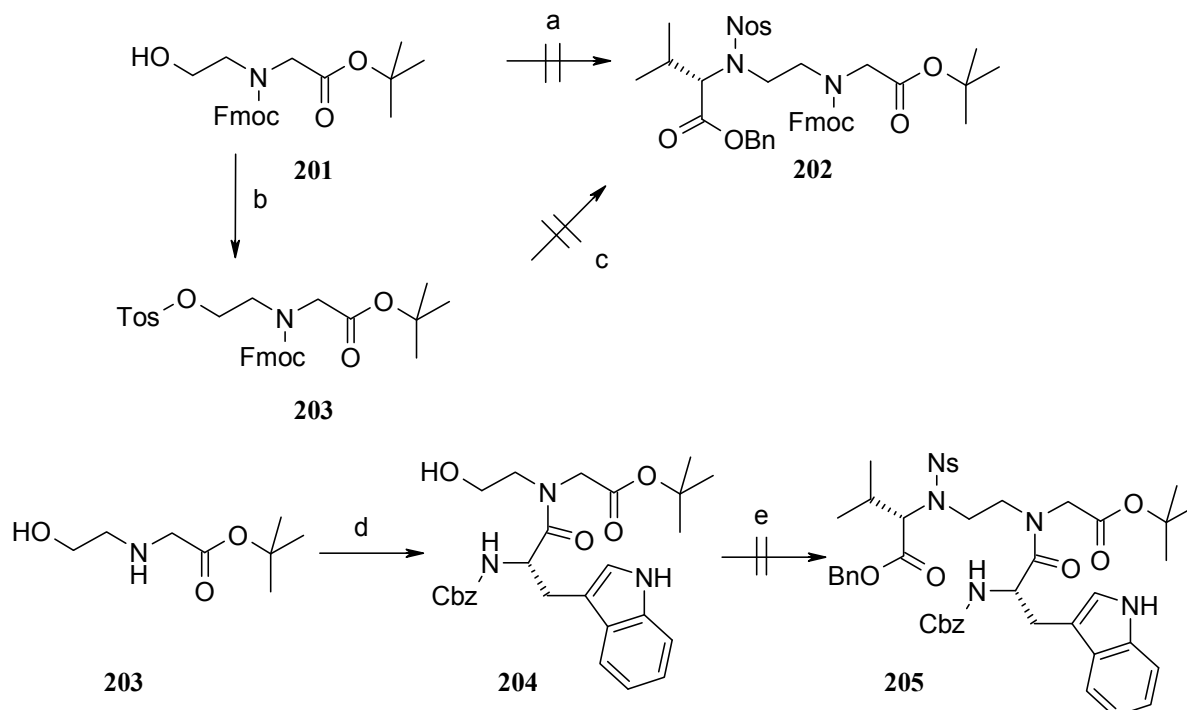
	Base	Bromethanol	Umsatz
	DBU 1.0 Äq.	2 Äq.	43 %
	DBU 1.5 Äq.	2 Äq.	56 %
	DBU 2.0 Äq.	2 Äq.	11 %
	DBU 1.5 Äq.	1 Äq.	4 %
	DBU 1.5 Äq.	3 Äq.	40 %
	DBU 1.5 Äq.	4 Äq.	54 %
	LiDMA 2.4 Äq.	2 Äq.	34 %
	NaH 2.2 Äq.	2 Äq.	26 %

Eine effiziente Alternative war die Darstellung des Fmoc geschützten Aminoalkohols **201** ausgehend von Bromessigsäure-*tert*-butylester (**199**) und Aminoethanol (**198**). Eine Verlängerung der Reaktionszeit von 24 h auf 48 h führte im Vergleich zur Literatur zu einer deutlich verbesserten Ausbeute von 94 %.^[276] Die Fmoc-Schützung wurde unter etablierten Standardbedingungen durchgeführt.^[277]

Schema 33: Darstellung des Fmoc-geschützten Aminoalkohols **201**

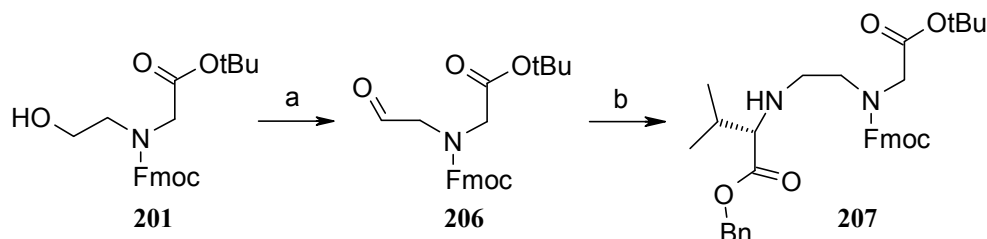
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) DMF, DIPEA, RT, 48 h, 94 %; b) Fmoc-Cl, THF/H₂O (2:1), NaHCO₃, RT, 16 h, 84 %.

Zum Einbau des Valins wurden verschiedene Syntheserouten erprobt. Die Überführung der Hydroxygruppe in das Tosylat **203**,^[278] gefolgt von einer Fukuyama-Alkylierung^[279] mit Nosyl-Valinbenzylester **96c** führte ebenso wenig zum Erfolg wie eine einstufige Fukuyama-Mitsunobu-Reaktion.^[280] Fukuyama-Mitsunobu-Reaktionen sind für *N*-Nosyl-Aminosäurederivate mit *N*-carbamateschutzten *N*-Alkylethanolaminen bekannt, jedoch gibt es ausschließlich Literaturbeispiele für Boc^[281-283] und Methylcarbamate.^[284] Reaktionen Fmoc-geschützter Verbindungen sind bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Eine umfangreiche Literatursuche lieferte Hinweise auf die unzureichende Stabilität der Fmoc-Gruppe unter Mitsunobu-Bedingungen.^[285,286] Das bei der Mitsunobu-Reaktion gebildete Hydrazid-Anion induziert die Deprotonierung des Fulvens und somit die Abspaltung der Fmoc-Gruppe. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der eigenen Reaktionen.

Schema 34: Untersuchte Reaktionen zur Einführung des Valinbausteins

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) **96c**, TPP, DEAD, THF; b) Tos-Cl, Pyridin, 0 °C - RT, 2 d, 48 %; c) **96c**, Cs₂CO₃, DMF, 80 °C; d) Cbz-Trp-OH, HATU, DIPEA, MeCN, 5 h, 78 %; e) **96c**, TPP, DEAD, THF.

Auch eine Umsetzung des Alkohols **204**, der durch Kupplung von Cbz-Trp-OH an das Amin **200** erhalten wurde, war nicht erfolgreich. Zwar wurde durch HPLC-MS-Analyse des Rohprodukts eine geringe Menge des Produkts **205** gefunden, das sich jedoch nicht in reiner Form isolieren ließ. Bei Mitsunobu-Reaktionen bereitet besonders die Abtrennung des entstandenen Triphenylphosphinoxids Probleme.

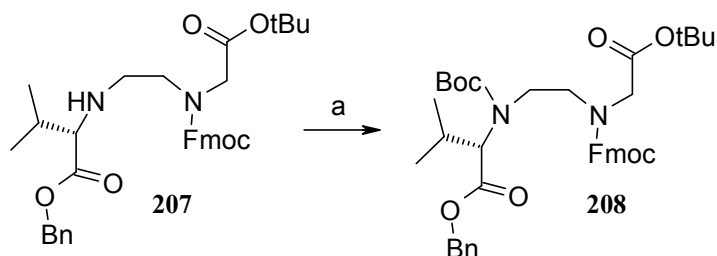
Schema 35: Swern-Oxidation mit anschließender reduktiver Aminierung

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Oxalylchlorid, DMSO, TEA, -78 °C b) Val-OBn, NaBH(AcO)₃, DMF, 24 h, RT, 77 % (2 Stufen).

Erfolgreich hingegen war die zweistufige Reaktionssequenz bestehend aus Swern-Oxidation des Alkohols **201** zum Aldehyd **206** und anschließender reduktiver Aminierung mit Valinbenzylester zum überbrückten Dipeptid **207**. Aufgrund der literaturbekannten Instabilität des Aldehydes wurde die reduktive Aminierung direkt mit dem Rohprodukt **206** durchgeführt.^[287] Als optimales Reduktionsmittel erwies sich Natriumtriacetoxyborhydrid, das sich

schon für ähnliche Systeme bewährt hat.^[287] Letztendlich wurde das Amin **207** nach Optimierung der Reaktionsbedingungen mit einer Ausbeute von 77 % erhalten.

Schema 36: Boc-Schätzung des freien Amins **207**



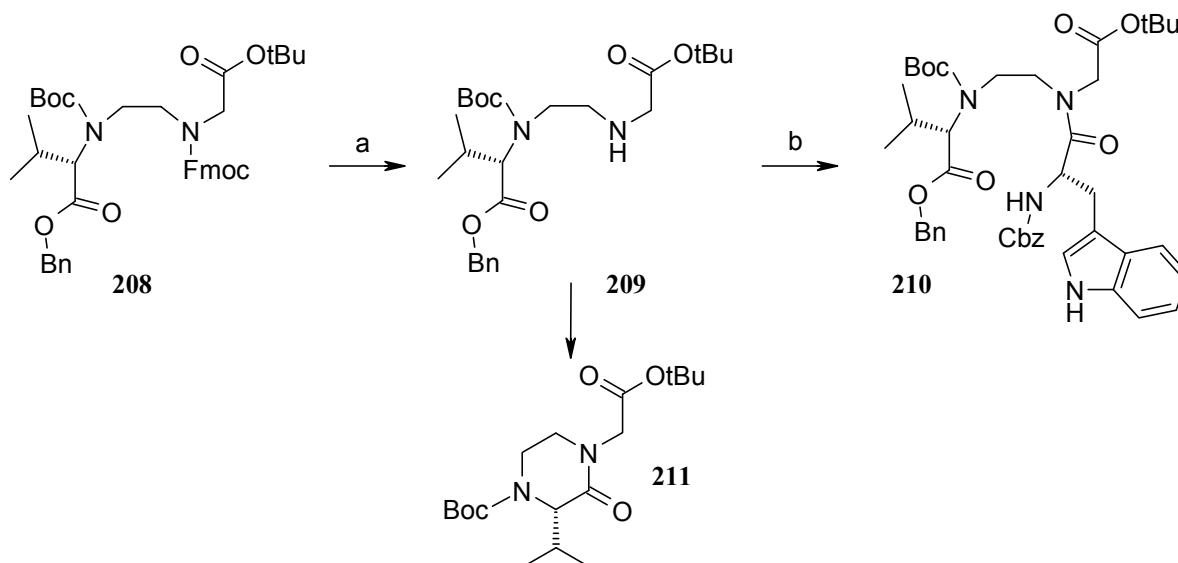
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Boc₂O, NaHCO₃, THF/H₂O, RT, 4 d, 88 %.

Aufgrund ihrer Orthogonalität zur Benzyl- und Fmoc-Gruppe erscheint die Boc-Gruppe als geeignete Schutzgruppe für die sekundäre Aminofunktion. Die Boc-Schätzung erwies sich hierbei jedoch als ungewöhnlich schwierig. Die Schätzung nach einer Standard-Vorschrift mittels Boc-Anhydrid und DIPEA in Dichlormethan zeigte eine partielle Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.^[288] Auch eine von Johnson publizierte Methode zur Boc-Schätzung besonders sterisch gehinderter Amine^[289] unter Verwendung von Tetramethylammoniumhydroxid scheiterte an der Instabilität der Fmoc-Gruppe gegenüber OH⁻. Erfolgreich wurde allerdings die Boc-Schätzung des Amins **207** in einem Zweiphasengemisch mit einem 10fachen Überschuss an Boc-Anhydrid durchgeführt.^[290] Nach 4 Tagen Reaktionsdauer wurde so das geschützte Amin **208** in 88 % Ausbeute erhalten. Die lange Reaktionsdauer in Verbindung mit dem Einsatz eines hohen Überschuss von Boc-Anhydrid weist auf eine ausgeprägte sterische Hinderung des Valin-Stickstoffes hin.

Die Spaltung der Fmoc-Gruppe zum Amin **209** zeigte ebenfalls einen hohen Optimierungsbedarf. Unter Standardbedingungen mit Piperidin in DMF wurde neben dem Produkt das 2-Ketopiperazin **211** erhalten.^[291] Dieses entsteht durch einen nukleophilen Angriff des freien sekundären Amins an die Esterfunktionalität unter Abspaltung von Benzylalkohol. Das chromatographisch gereinigte Produkt **209** cyclisierte ebenfalls, so dass nach einer Lagerdauer von 36 h ein erheblicher Anteil des 2-Ketopiperazins gefunden wurde. Zur Vermeidung langer Aufarbeitungs- und Chromatographiezeiten wurde anstatt des schwerflüchtigen Piperidin/DMF-Gemisches eine Mischung aus DEA und DCM (1:1) verwendet.^[292] Diese leichtflüchtigen Reagenzien wurden nach abgeschlossener Reaktion destillativ abgetrennt und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung mit Cbz-Trp-OH gekuppelt. Das bei der Fmoc-Spaltung entstandene Dibenzofulvenaddukt beeinflusste die mit BOP-Cl als Kupplungsreagenz durchgeführte Peptidknüpfung nicht und wurde bei der anschließenden chromatographi-

schon Reinigung des Peptids **210** abgetrennt. Die Gesamtausbeute über beide Stufen betrug 57 %.

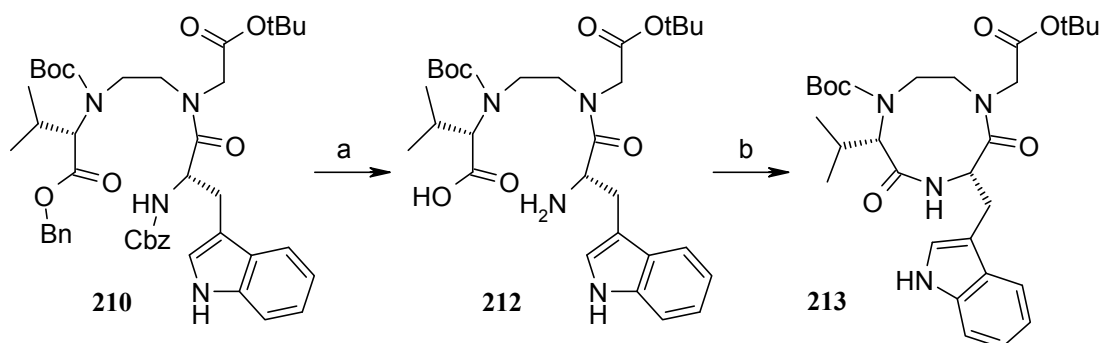
Schema 37: Optimierung der Fmoc-Spaltung gefolgt von der Peptidknüpfung



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) DEA/DCM 1:1, 70 min, RT; b) Cbz-Trp-OH, BOP-Cl, DIPEA, DCM, RT, 21 h, 57 % (über beide Stufen).

Die hydrogenolytische Spaltung der Benzyl- und Cbz-Gruppe wurde mit dem Pearlman Katalysator^[293] unter 1 bar Wasserstoffatmosphäre erfolgreich durchgeführt und lieferte das überbrückte Peptid **212** in quantitativer Ausbeute. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für die Cyclisierung eingesetzt. Die Verwendung von Palladium auf Aktivkohle führte zu einem untrennbaren Produktgemisch. Die Cyclisierung zum 1,4,7-Triazonan-2,5-dion **213** wurde unter Hochverdünnung (Ruggli-Ziegler Prinzip) mittels HATU-Aktivierung durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurde der Cyclus **213** in 64 % Ausbeute erhalten.

Schema 38: Cyclisierung zum Triazonandion

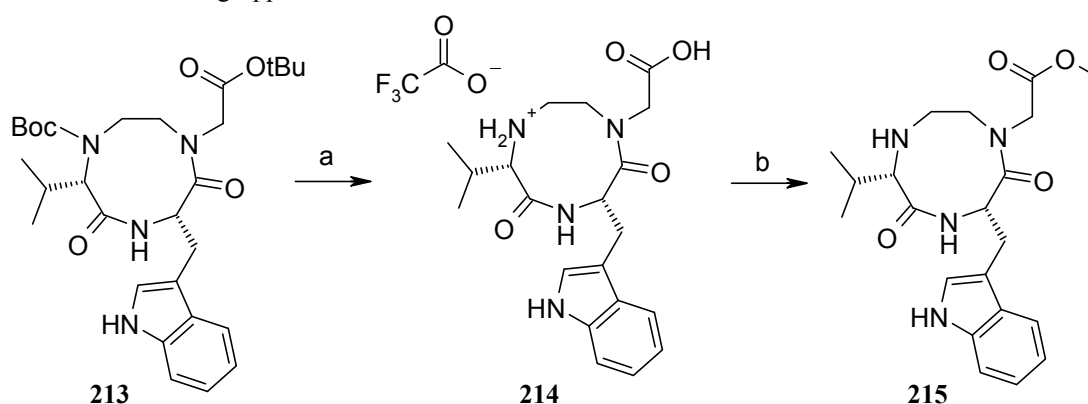


Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H₂, Pd(OH)₂/C, EtOH, 1 h, 100 % ; b) HATU, DIPEA, DCM, 18 h, 64 %.

Der Cyclus **213** wurde mit TFA/DCM/TIS (1:1:0.1) C- und N-terminal entschützt. Der entstandene Cyclus **214** wurde jedoch aufgrund seiner hohen Polarität nicht weiter aufgereinigt und direkt mit Thionylchlorid in Methanol zum Methylester **215** in 73 % Ausbeute über beide Stufen umgesetzt.

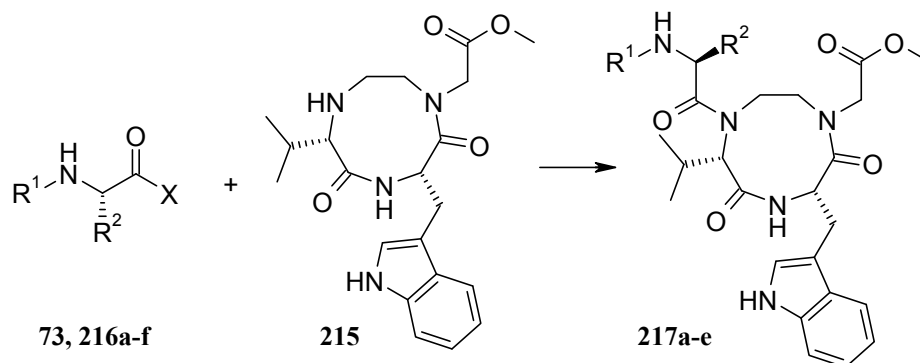
Die Überführung des Methylesters in das endständige Amid gelang weder durch die Verwendung von ammoniakalischer Methanollösung^[203,294] noch nach einer von Ley vorgestellten Methode durch Erhitzen des Methylesters mit Magnesiumnitrid in Methanol.^[295] Da mehrere Testversuche scheiterten wurde versucht, das fehlende Tripeptid an den Cyclus zu kuppeln und anschließend den C-Terminus in das Amid zu überführen.^[296]

Schema 39: Schutzgruppentransformation des Triazonandions **213**



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) TFA/TIS/DCM 1:1:1, 2.5 h; b) SOCl₂, MeOH, RT, 18 h, 73 % .

Das benötigte N-terminal- und seitenkettengeschützte Tripeptid Fmoc-Tyr(*t*Bu)-Phe-Ser(*t*Bu)-OH (**73**) wurde unter Verwendung der Festphasensynthese am 2-Chlortritylchlorid-harz synthetisiert.^[171] Für die Anknüpfung des Tripeptides wurden verschiedene Bedingungen getestet. Sowohl die für Kupplung an sekundäre Amine besonders geeigneten Kupplungsreagenzien BOP-Cl,^[237] HATU^[236] und PyBrOP^[297] wie auch Standardmethoden unter EDC/HOBt-Aktivierung blieben erfolglos. Weiterhin zeigte sowohl die *in situ* Bildung von Säurefluoriden mittels BTFFH^[298] wie auch Erhitzen des Reaktionsgemisches unter PyBrOP-Aktivierung laut HPLC-MS der Rohprodukte keine Spur des acylierten Cyclus **217a**. Selbst das reaktive Säurechlorid Fmoc-Ser(*t*Bu)-Cl **216b** ergab keine Kupplung (Tabelle 18). Eine mögliche Ursache für die erfolglosen Kupplungsversuche liegt in der hohen sterischen Abschirmung des sekundären Valin-Stickstoffs.

Schema 40: Versuch der Kupplung verschiedener Aminosäurederivate an das Turnmimetikum **215**

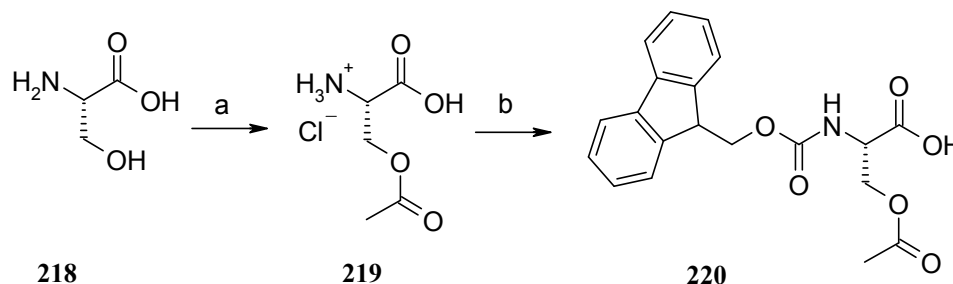
Zur Überprüfung der Theorie des hohen sterischen Raumanpruchs wurde anstelle des Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH das sterisch weniger anspruchsvolle Fmoc-Ala-OH (**216c**) gekuppelt. Dieser Ansatz zeigte nach anderthalb Tagen laut HPLC-MS des Rohprodukts einen deutlichen Produktpeak (Produkt/Edukt, 1:5.7). Die Verwendung des sterisch weniger gehinderten Fmoc-Ser(Bn)-OH (**216d**) brachte keine Verbesserung der Ausbeute.

Tabelle 18: Versuche zur Kupplung von Aminosäuren an den Cyclus **215**

Aminosäure/Peptid	Lösungsmittel	Kupplungsbed.	Umsatz
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (73)	DCM	BOP-Cl	-
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (73)	MeCN	BOP-Cl	-
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (73)	MeCN	HATU	-
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (73)	MeCN	PyBrOP	-
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (73)	DCM	EDC/HOBt	-
Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (216a)	DCM	BTFPH	-
Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (216a)	DMF	PyBrOP/100 °C	-
Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-Cl (216b)	DCM	-	-
Fmoc-Ala-OH (216c)	MeCN	HATU	1:5.7 ¹⁾
Fmoc-Ser(Bn)-OH (216d)	MeCN	HATU	14 % ²⁾
Fmoc-Ser(Bn)-Cl (216e)	DCM	-	-
Fmoc-Ser(Ac)-OH (216f)	MeCN	HATU	25 % ²⁾ 221

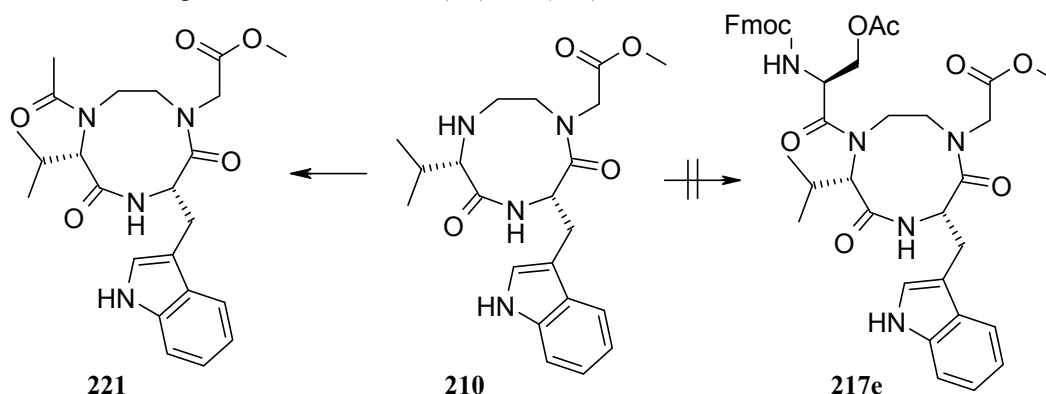
¹⁾ Verhältnis Produkt/Edukt laut HPLC-MS, ²⁾ isolierte Ausbeute

Zur weiteren Verringerung des sterischen Anspruches am Serin sollte eine kleinere Seitenkettenschutzgruppe vielversprechend sein. Hierfür bietet sich die Acetylschutzgruppe an. Durch Seitenkettenacetylierung ausgehend von Serin **218** wurde Ser(Ac)-OH·HCl (**219**) nach einer Vorschrift von Wilchek und Patschornik in guter Ausbeute erhalten.^[299] Anschließende Fmoc-Schutzung lieferte Fmoc-Ser(Ac)-OH (**220**) in 59 % Ausbeute.

Schema 41: Darstellung von Fmoc-Ser(Ac)-OH (**220**)

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) AcCl, 6 M HCl, HOAc, 10 min, 91 %; b) Fmoc-Cl, NaHCO₃, THF/H₂O, RT, 18 h, 59 %.

Kupplungsversuche von Fmoc-Ser(Ac)-OH (**220**) an den Cyclus **215** mit HATU als Kupplungsreagenz lieferten auch nach 44 h nicht das gewünschte Produkt **217e**. Stattdessen wurde das acetylierte Triazonandion **221** als Hauptprodukt erhalten. Unter HATU-Aktivierung kommt es hierbei wahrscheinlich zu einem Acyltransfer auf das HOAt und der Bildung eines Acetyl-Aktivesters. Dieser scheint aufgrund seines geringen sterischen Anspruchs deutlich reaktiver zu sein als die sterisch stärker gehinderten Aminosäureaktivester. Aufgrund der unbefriedigenden Kupplungsergebnisse wurde dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt.

Schema 42: Umsetzung von **215** mit Fmoc-Ser(Ac)-OH (**220**)

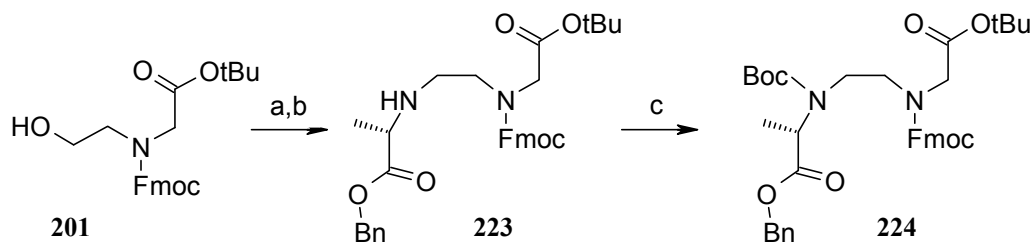
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: **220**, HATU, MeCN, RT, 44 h, 25 %.

4.2.3.5 Darstellung des Alaninanalogs

Als Schlussfolgerung aus den bisherigen Ergebnissen sollte nun anstelle des Valins das sterisch weit weniger anspruchsvolle Alanin eingebaut werden. Aus dem Alanin-Scan ist eine vollständig erhaltene Wirkung des [Ala⁴]-Helicokinin I im Rezeptor-Assay bekannt (siehe S. 23). Das Amin **223** wurde ausgehend vom Alkohol **201** in 60 % Ausbeute hergestellt. Der für die reduktive Aminierung benötigte Alaninbenzylester (**222**) wurde nach einer Vorschrift von Tong^[300] in guter Ausbeute (75 %) synthetisiert. Der deutlich geringere sterische Anspruch des Alanins verglichen zum Valin zeigt sich bei der Boc-Schätzung (1.5 Äq.), die nach 17 h

Reaktionszeit in 75 % Ausbeute das Carbamat **224** lieferte. Beim Valinderivat **207** waren hingegen 10 Äq. Boc_2O nötig und die Reaktionszeit betrug 4 Tage.

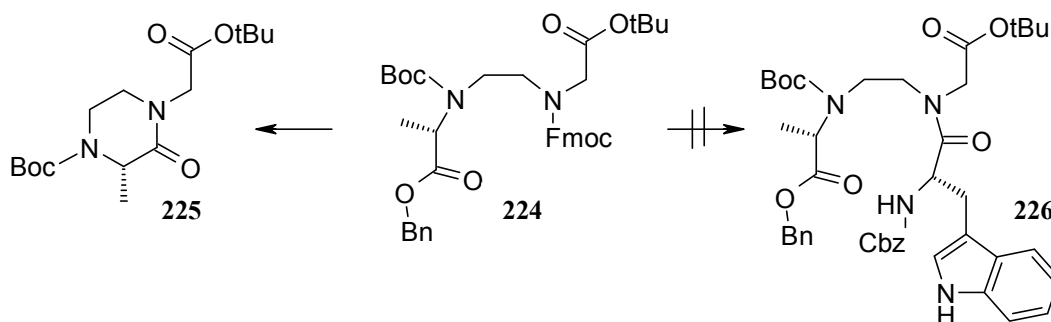
Schema 43: Synthese des überbrückten Dipeptids



Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Oxalylchlorid, DMSO, TEA, DCM, $-78\text{ }^\circ\text{C}$; b) **222**, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, DMF, 17 h, RT, 60 % über 2 Stufen; c) Boc_2O , $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$, THF, 17 h, 75 %.

Bei der Fmoc-Spaltung hingegen wirkte sich der verminderte sterische Anspruch des Alanins nachteilig aus. Während beim Valinderivat **208** nach Fmoc-Spaltung mittels DEA/DCM (1:1) und anschließender Kupplung des Tryptophans unter BOP-Cl Aktivierung in 57 % das überbrückte Dipeptid **210** erhalten wurde, bildete sich beim Alanin-Derivat ausschließlich das 2-Ketopiperazin **225**. Versuche, die Fmoc-Gruppe unter Ausnutzung ihrer Instabilität gegenüber $\text{DMAPI}^{[301]}$ zu spalten und das entstandene Amin direkt in Gegenwart von Cbz-Tryptophan zum Peptid **226** zu kuppeln, waren ebenfalls nicht erfolgreich.

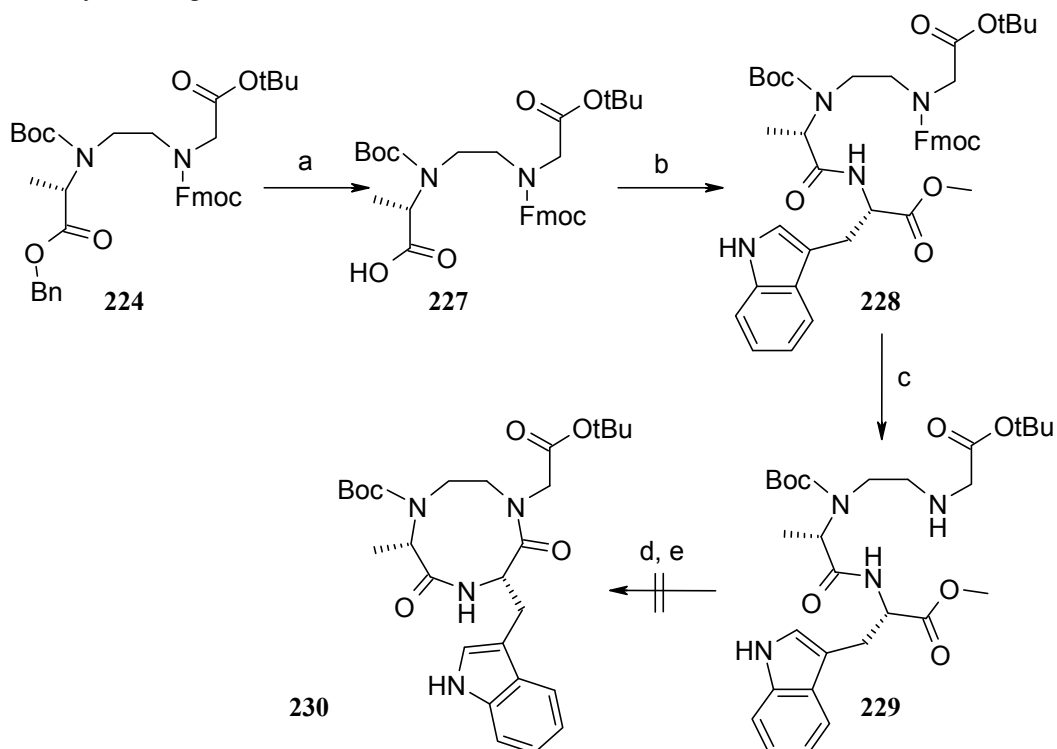
Schema 44: Versuch der Fmoc-Spaltung



Als Alternativen wurden zwei weitere Syntheserouten verfolgt. Der erste Ansatz setzt auf die Verknüpfung des Alanins mit Tryptophan und anschließender Cyclisierung durch Kupplung der Säurefunktion des Tryptophans an den sekundären Glycin-Stickstoff. Hierfür wurde der Benzylester **219** unter sorgfältiger Reaktionskontrolle hydrogenolytisch zur Carbonsäure **227** gespalten.^[301] Das Amin **229** wurde durch Kupplung der Säure **227** mit Tryptophanmethylester zum Peptid **228** (80 % Ausbeute) und darauf folgender Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe (52 % Ausbeute) hergestellt. Der Methylester **229** wurde mit LiOH gespalten und das Rohprodukt direkt für die nachfolgende Cyclisierung verwendet. Bedauerlicherweise wurde bei der Cyclisierung nicht einmal eine Spur des Triazonandions **230** gefunden. Der Misserfolg der Cyclisierungsreaktion kann durch die vorwiegende *trans*-Konfiguration der sekundären

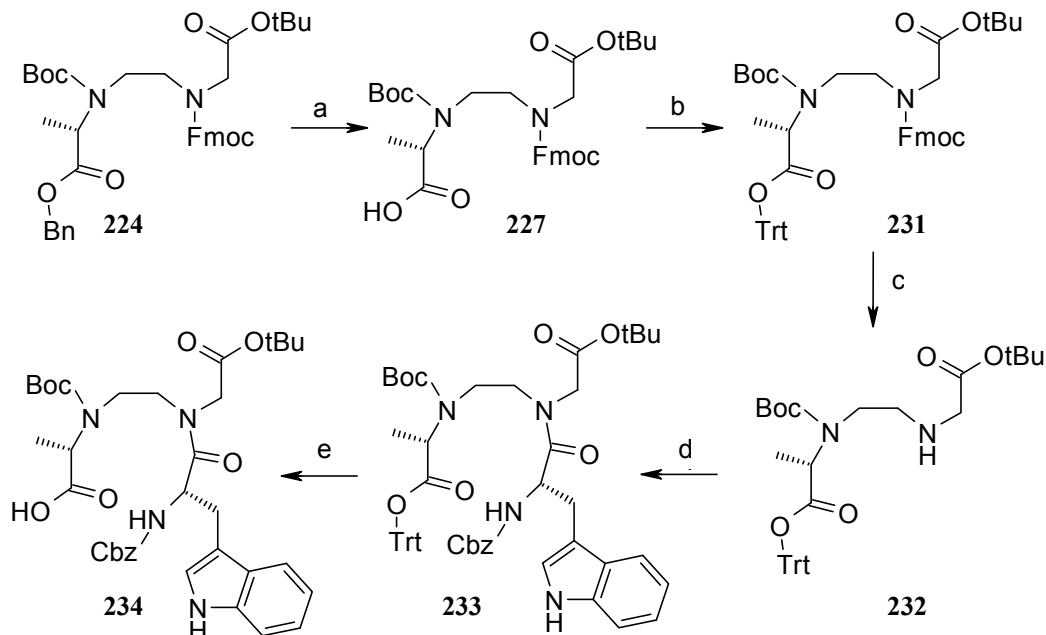
Amidbindung erklärt werden. Die *trans*-Amidbindung induziert eine gestreckte Konformation, in der die Amino- sowie die Carboxyunktionalität keine Möglichkeit haben, sich räumlich anzunähern. Dies deckt sich mit der Aussage von Davies, nach dem sich tripeptidische Strukturen schlecht cyclisieren lassen, solange nicht tertiäre Amidbindungen im Molekül die *cis*-Isomere begünstigen.^[269]

Schema 45: Cyclisierungsversuch zum Turnmimetikum **230**



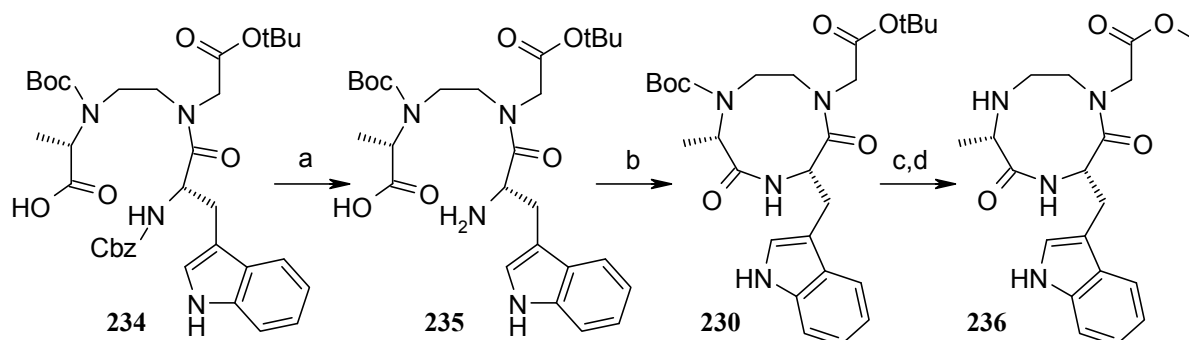
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H₂, Pd(OH)₂/C, EtOH, 3 h, RT, 96 %; b) **156**, HATU, DIPEA, DCM, 17 h, RT, 80 %; c) Piperidin, DCM, 2 h, RT, 52 %; d); LiOH, THF/H₂O, RT, 99 %; e) HATU, DCM, RT.

Die zweite Syntheseroute basiert auf der ursprünglichen für das Valin-Derivat etablierten Reaktionssequenz. Allerdings wurde anstatt des Benzylesters die Tritylgruppe als Schutzgruppe für die Carbonsäure verwendet. Durch diese Schutzgruppentransformation wurde der sterische Anspruch des Valins drastisch erhöht und die Alanin-Carbonylgruppe vor dem intramolekularen Angriff des sekundären Amins abgeschirmt.^[302] Die Fmoc-Spaltung zum Amin **232** und Kupplung mit Cbz-Tryptophan lieferte das Produkt **233** in 55 % Ausbeute über beide Stufen. Aufgrund der Labilität des Tritylesters während der säulenchromatographischen Reinigung musste die Chromatographiedauer möglichst kurz gehalten werden. Nach Optimierung wurde das überbrückte Dipeptid **233** ausgehend von der Säure **227** in 63 % Gesamtausbeute erhalten. Die Tritylspaltung wurde durch Rühren des Tritylesters in Ethanol erreicht.

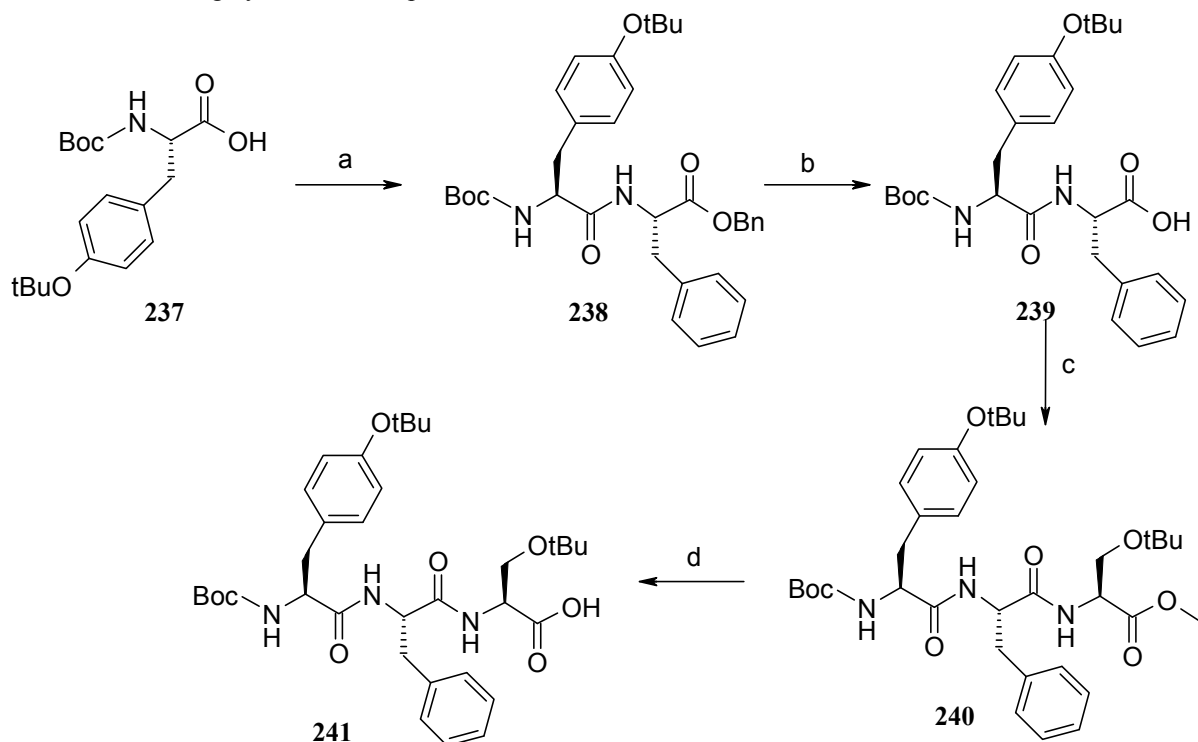
Schema 46: Alternative Darstellung des überbrückten Dipeptids

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H₂, Pd(OH)₂/C, EtOH, 3 h, RT, 96 %; b) Trt-Cl, DCM, RT, 90 min, 53 %; c) Piperidin, DCM, RT, 3 h, 80 %; d), Cbz-Trp-OH, BOP-Cl, DIPEA, DCM, RT, 18.5 h, 69 %, e) EtOH, 21 h, RT, 93 %.

Die hydrogenolytische Spaltung der Cbz-Schutzgruppe lieferte das Peptid **235** in 97 % Ausbeute, das direkt unter Hochverdünnungsbedingungen zum cyclischen Peptid **230** cyclisiert wurde (63 %). Die Spaltung der Boc- und *t*Bu-Schutzgruppe und Veresterung der entstandenen Säure mit Thionylchlorid lieferte den Methylester **236** in 48 % Ausbeute.

Schema 47: Synthese des Triazonandions **236**

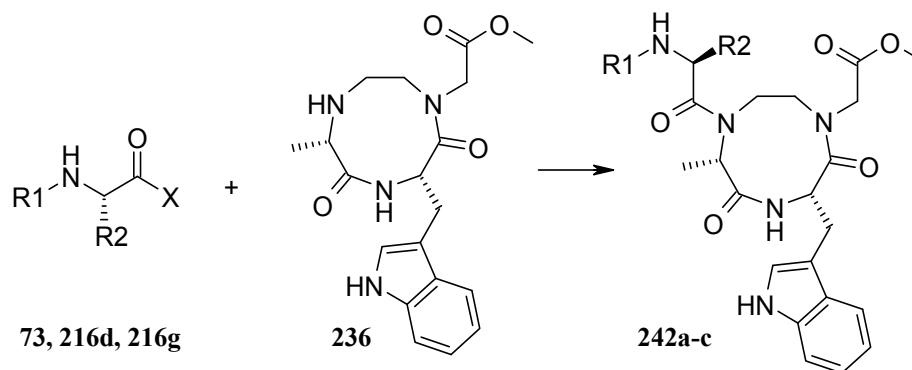
Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H₂, Pd(OH)₂/C, EtOH, RT, 2 h, 97 %; b), HATU, DCM, DIPEA, RT, 21.5 h, 63 %; c) TFA, DCM, TIS, 0 °C - RT, 2 h; d) SOCl₂, MeOH, 0 °C, 48 %.

Schema 48: Lösungssynthese des Tripetids **241**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Phe-OBn*HCl, HATU, TEA, DCM, 16 h, RT, 89 %; b) H₂, Pd/C, EtOH, 6h, RT, 100 %; c) Ser(*t*Bu)-OMe*HCl, HATU, DIPEA, MeCN, 18 h, RT, 97 %, d) LiOH, THF/H₂O (2:1), 15 h, RT, 100 %.

Trotz des Wechsels des Isopropyl- **215** auf den sterisch weniger anspruchsvollen Methylrest **236** erwies sich die Anknüpfung des restlichen Peptids an den Makrocyclus **236** als schwierig. Insgesamt wurden Kupplungsversuche mit drei unterschiedlichen Peptiden durchgeführt, die sich im sterischen Anspruch des Serins unterscheiden (Tabelle 19). Das verwendete Boc-Tyr(*t*Bu)-Phe-Ser(*t*Bu)-OH (**241**) wurde durch Standardpeptidchemie in Lösung gemäß Schema 48 in guter Gesamtausbeute synthetisiert. Die direkte Anknüpfung eines Tripeptids besitzt eine höhere Konvergenz, so dass dadurch eine Steigerung der Gesamtausbeute möglich ist. Zusätzlich werden ungewollte Nebenreaktionen wie die später festgestellte Cyclisierung des Peptids **242c** zu **243** vermieden. Die Verwendung der sterisch weniger anspruchsvollen Benzylschutzgruppe im Serin resultiert in einem zusätzlichen Reaktionsschritt um diese hydrogenolytisch zu spalten. Besonders problematisch erscheint in diesem Zusammenhang die Empfindlichkeit des Indol-Systems gegenüber Hydrierung zum Indolin.^[303,304] Die Anknüpfung des Tripeptids **73** unter HATU-Aktivierung lieferte das Produkt **242a** in nur 22 % als Epimerengemisch (3:1).

Die Anknüpfung des Boc-geschützten Tripeptids **241** mit HATU als Kupplungsreagenz gelang auch unter erhöhter Temperatur (40 °C) nicht. Eine BEP/HOAt-vermittelte Kupplung zeigte nach HPLC-MS-Analytik auch nach drei Tagen nur einen geringen Umsatz.

Schema 49: Kupplung an das Triazonanon **236**

Die Umsetzung mit DIC/HOBt unter Erwärmung in einer Mikrowelle nach einer Vorschrift von Bradley zeigte ebenfalls keinen Umsatz.^[305] Eine Peptidkupplung in der Mikrowelle unter BEP-Aktivierung lieferte das Produkt in immerhin 36 % Ausbeute als Diastereomerenmisch. Das sterisch weniger gehinderte Fmoc-Ser(Bn)-OH wurde unter HATU-Aktivierung und erhöhter Temperatur erfolgreich mit dem Turnmimetikum **236** in einer Ausbeute von 40 % verknüpft.

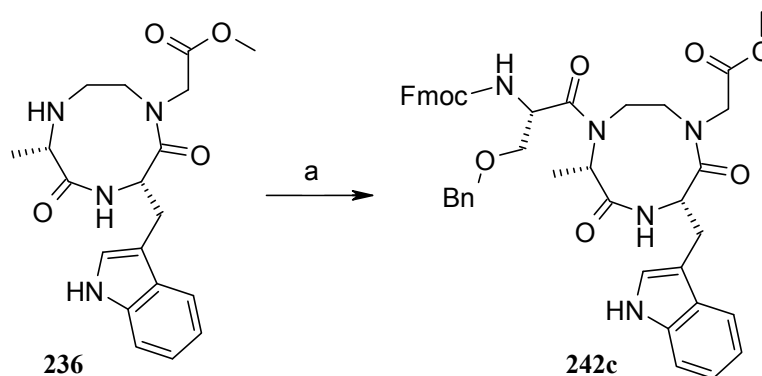
Tabelle 19: Testversuche der Peptidkupplung an das Turnmimetikum **236**

Aminosäure/Peptid	Lösungsmittel	Kupplungsbed.	Umsatz
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (73)	DCM/DMF (1:1)	HATU/4 d/RT	22 % ¹⁾ Epimere (3:1)
Boc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (216g)	DMF	HATU/10 d/45 °C	- ⁴⁾
Boc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (216g)	DMF	HATU/11 d/40 °C	- ⁴⁾
Boc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (216g)	DMF	BEP/HOAt/3 d/RT	27 % ⁴⁾
Boc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (216g)	DMF	DIC/HOBt ³⁾	- ⁴⁾
Boc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-OH (216g)	MeCN	BEP/HOAt ²⁾	36 % Epimere (1:1) ¹⁾
Fmoc-Ser(Bn)-OH (216d)	DMF	HATU/11 d/40 °C	40 % ¹⁾

¹⁾ isolierte Ausbeute; ²⁾ Mikrowelle 2x 20 min 60 °C, 1x 40 min 60 °C, 1x 40 min 80 °C; ³⁾ MW: 2x 5 min, 60 °C;

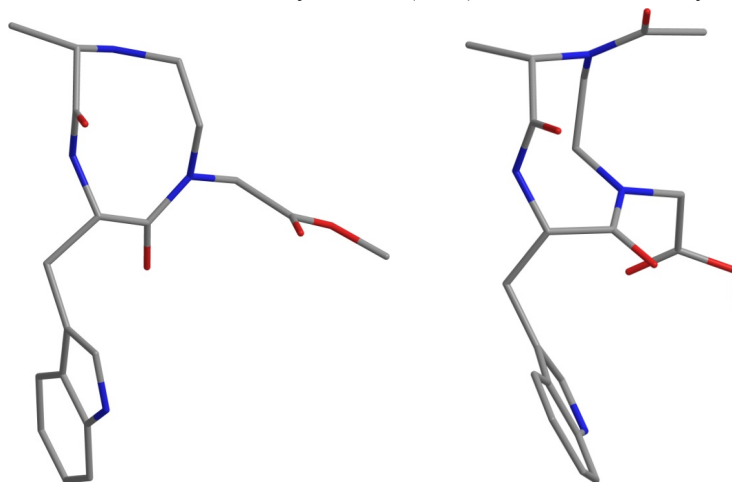
⁴⁾ Umsatz laut HPLC-MS

Die Ergebnisse der *N*-terminalen Funktionalisierung lassen darauf schließen, dass die Ursache für die Kupplungsprobleme nicht ausschließlich in sterischen Hinderungseffekten zu suchen ist. Die Schwierigkeiten der Peptidkupplung an das Turnmimetikum **236** sowie **215** liegen wahrscheinlich in einer nötigen konformativen Änderung begründet, die in der Acylierungsreaktion stattfinden muss.

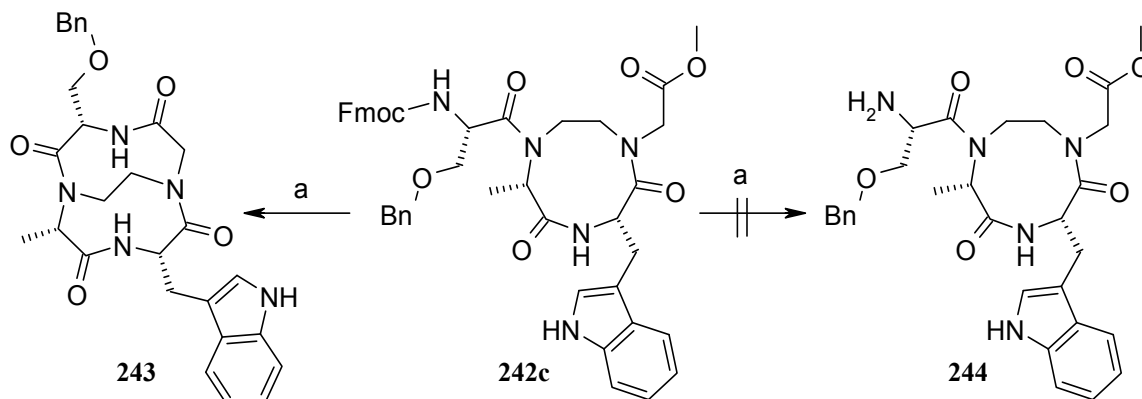
Schema 50: Anknüpfen des Fmoc-Ser(Bn)-OH an das Turnmimetikum **236**

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Fmoc-Ser(Bn)-OH, HATU, DIPEA, DMF, 11 d, 40 °C, 40 %.

Die energieminierten Konformationen des Cyclus **236** sowie eines formal acylierten Cyclus sind in Abb. 66 gezeigt.^[211] Ein besonders deutlicher Unterschied ist innerhalb der C₂-Brücke und des Valin-Stickstoffs ersichtlich. Der Acetyl- und der Methylrest ordnen sich so an, dass ihre sterische Abstoßung untereinander minimiert wird. Die starke konformative Änderung hat vermutlich eine hohe Aktivierungsenergie zur Folge.

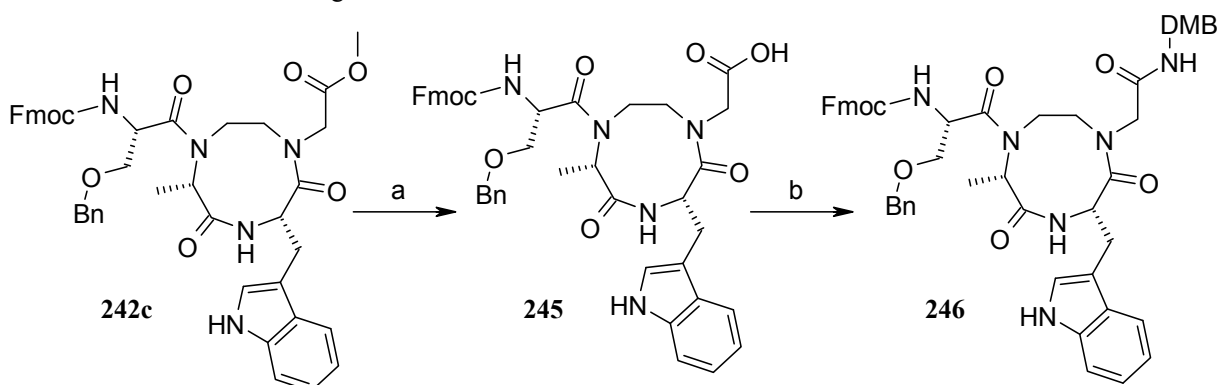
Abb. 66: Energieminimierte Konformation des Cyclus **236** (links) sowie des formal acylierten Cyclus (rechts)

Bei der Fmoc-Spaltung des Peptids **242c** wurde nicht das freie Amin **244** erhalten, sondern das Cyclisierungsprodukt **243**. Dieses entsteht durch nukleophilen Angriff des intermediär gebildetenamins **244** auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Glycinmethylesters. Intramolekulare Cyclisierung unter Spaltung von Methylestern sind bei der Bildung von Diketopiperazinen seit langem bekannt.^[306-310] Die analoge Cyclisierung vom *N*- zum *C*-Terminus tetrapeptidischer Strukturen wurde bemerkenswerterweise bisher nicht in der Literatur beschrieben. Weiterhin sind weder dieses bicyclische Grundgerüst, noch andere in dieser Form überbrückte cyclische Tetrapeptide literaturbekannt.

Schema 51: Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Piperidin, DMF, 2.5 h, RT, 75 %.

Die guten Ausbeuten der Cyclisierung weisen darauf hin, dass sich der C- und der N-Terminus in direkter räumlicher Nähe zueinander befinden. Aufgrund der problematischen N-terminalen Funktionalisierung wurde als nächstes versucht, den C-Terminus mit einem sterisch gehindertem Amin zu modifizieren und anschließend das Dipeptid an den N-Terminus zu koppeln. Für die Spaltung des Methylesters wurde sowohl die bisher etablierte Methode mit LiOH als auch eine von Nicolaou entwickelte Methode untersucht.^[311] Letztere zeigte trotz insgesamt 20 Äq. Trimethylzinnhydroxid auch nach sieben Tagen keinen vollständigen Umsatz. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 30 % isoliert. Durch Esterverseifung mit LiOH wurde innerhalb von 30 Minuten die Säure **245** in 46 % Ausbeute erhalten, allerdings unter partieller Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Die freie Säure **245** ließ sich dann in guter Ausbeute an Dimethoxybenzylamin kuppeln.^[312]

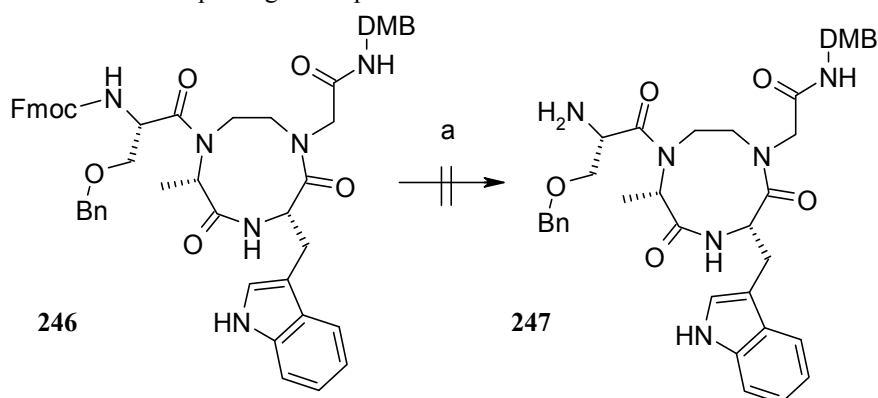
Schema 52: Funktionalisierung des C-Terminus

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) LiOH, THF/H₂O (2:1), 30 min, RT, 46 %, b) DMBA, HATU, DCM, DIPEA, 15 h, RT, 86 %.

Eine vollständige Entschützung der Fmoc-Gruppe wurde durch Umsetzung mit Piperidin innerhalb von 30 Minuten erreicht. Das freie Amin **247** wurde durch HPLC-MS-Analyse des Rohprodukts nur in Spuren nachgewiesen, neben weiteren, größtenteils nicht identifizierbaren

Nebenprodukten. Ein Nebenprodukt ist das Cyclisierungsprodukt **243**, das schon bei der Fmoc-Spaltung von **242c** identifiziert wurde. Ein weiteres UV-intensives Signal weist auf die Abspaltung des Dimethoxybenzylkations hin. Der Grund für die Instabilität des Produkts ist nicht bekannt und konnte aufgrund der geringen verbliebenen Substanzmenge nicht weiter untersucht werden.

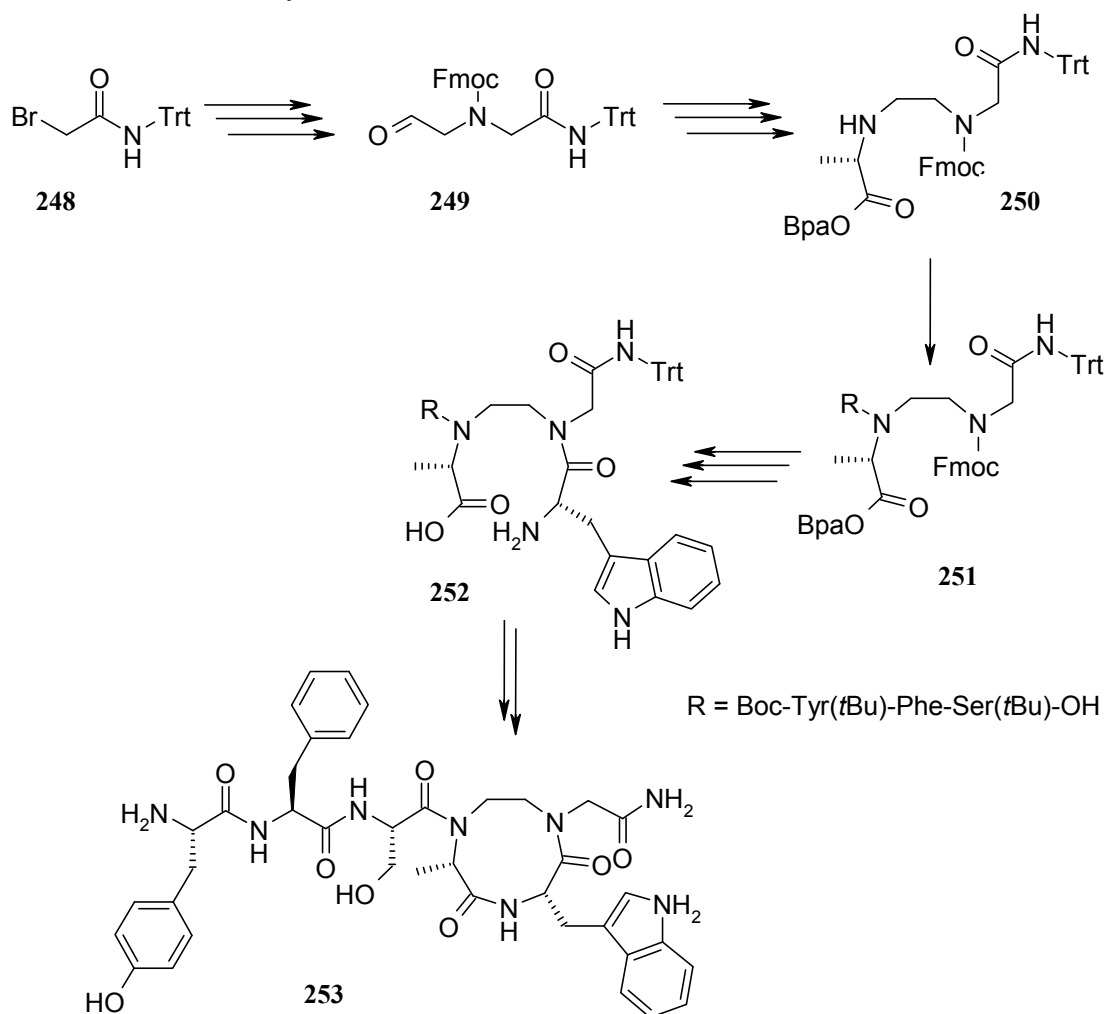
Schema 53: Versuch der Fmoc-Spaltung des Peptides **246**



Aufgrund der geringen Ausbeute und des hohen Optimierungsbedarfs der Synthesesequenz in verschiedensten Reaktionsschritten wäre eine Nachsynthese des Cyclus **246** notwendig gewesen. Die intensive Analyse aller aufgetretenen, unerwarteten Probleme und Nebenreaktionen legt eine weitere Änderung der Synthesesequenz nahe, die im folgenden Abschnitt vorgestellt wird.

4.2.3.6 Planung einer alternativen Syntheseroute

Die Hauptprobleme der bisherigen Syntheseroute stellen die Überführung des Glycinesters in das C-terminale Amid, die Anknüpfung des Serins an das cyclische Triazonandion sowie die Vermeidung der Cyclisierung zu 2-Ketopiperazinen dar. Unabhängig davon sollte die bisherige Syntheseroute grundlegend beibehalten werden, um von den gemachten Erfahrungen zu profitieren. Die Verwendung eines geeigneten *N*-alkylierten Bromessigsäureamids sollte sowohl die sterische Abschirmung des Carbonyl-Kohlenstoffes als auch die Freisetzung des ungeschützten Amids unter aziden Bedingungen ermöglichen. Hierbei bieten sich 2-Brom-*N,N*-bis(2,4-dimethoxybenzyl)acetamid^[313] oder 2-Brom-*N*-tritylacetamid als Ausgangsstoffe an. Tritylamide können durch Kupplung von Tritylamin an Carbonsäuren hergestellt werden. Sie sind mittlerweile sowohl als Zwischenprodukte zur Amidierung von Carbonsäuren, als auch als Schutzgruppen für endständige Amide etabliert.^[314-316]

Schema 54: Alternative Syntheseroute zum Turnmimetikum **253**

Der Aldehyd **249** kann ausgehend vom 2-Brom-*N*-tritylacetamid (**248**) durch Umsetzung mit Ethanolamin, Fmoc-Schützung und anschließender Swern-Oxidation synthetisiert werden. Die *C*-terminale Schutzgruppe des Alanins muss mehrere unerlässliche Bedingungen erfüllen:

- ausreichende Stabilität zur Durchführung von reduktiven Aminierungen, Fmoc-Spaltungen und Peptid-Kupplungen,
- Orthogonalität zu Trityl- und *t*Bu-Estern sowie Carbamat-Schutzgruppen und
- Stabilität gegenüber chromatographischen Reinigungen und Feuchtigkeit.

Triisopropylsilylester erfüllen die ersten beiden Voraussetzungen. Ihre Orthogonalität begründet sich auf der Möglichkeit der Fluorid-induzierten Spaltung. Zusätzlich sind sie gegenüber den notwendigen Reaktionsbedingungen stabil.^[317-320] Obwohl Triisopropylsilylester stabiler als analoge Trimethylsilyl- und *tert*-Butyldimethylsilylester sind, ist ihre Labilität besonders gegenüber Feuchtigkeit und schwach aziden Bedingungen problematisch. Ihre Stabilität ist mit der von Tritylestern vergleichbar, die sich in der bisher verwendeten Synthese-

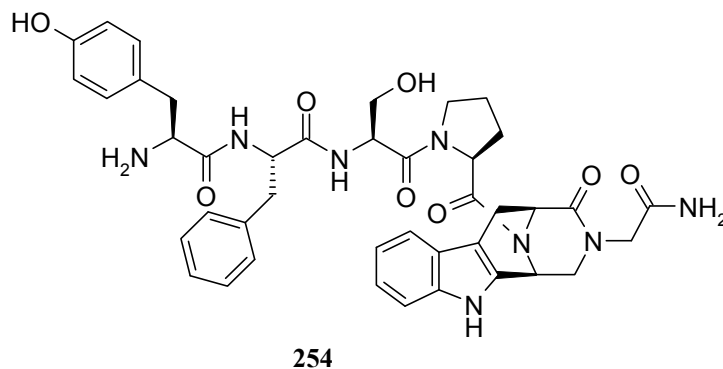
route als unzweckmäßig für die effiziente Durchführung längerer Synthesesequenzen erwiesen. Bannwarth beschrieb vor kurzem die Verwendung von chelatbildenden Carbonsäureamiden als Relay-Schutzgruppen für Carbonsäuren.^[321] Die experimentell erwiesene Kompatibilität der Bispicolylamide mit reduktiven Aminierungen und Peptidkupplungen, ihrer Orthogonalität zu Fmoc- und Boc-Schutzgruppen sowie der milden Kupfer-katalysierten Spaltungsmethode, lassen sie als ideale Schutzgruppe für das Alanin erscheinen.

Das Problem, die Peptidkette an das 9-gliedrige Ringsystem anzuknüpfen, kann umgangen werden, indem nicht wie bisher eine intermediäre Schützung des Amins **250** durchgeführt sondern direkt das Tripeptid **241** angeknüpft wird. Der vorteilhafte Aufbau der kompletten Peptidkette vor einer Cyclisierung wurde in der Synthese des bicyclischen Turnmimetikums bereits festgestellt (Abschnitt 4.2.1.3, S. 67 ff.). Nach dem Aufbau des peptidischen Systems **251**, Fmoc-Spaltung, Kupplung von Fmoc-Trp und Entfernung der Fmoc- und der BPA-Schutzgruppe zum Peptid **252** sollte die Cyclisierung zum 9-gliedrigen Makrocyclus unter Hochverdünnung möglich sein. Die komplette Entschützung führt zum Turn-Mimetikum **253**. Durch die hier vorgestellte alternative Syntheseroute scheint eine erfolgreiche Synthese des C₂-überbrückten Helicokinin I möglich. Verglichen mit den bisherigen getesteten Syntheserouten zeichnet sie sich durch eine deutlich geringere Anzahl von Reaktionsschritten aus. Besonders die Bpa-Schutzgruppe und das C-terminale Tritylamid bergen ein hohes Potential für die Synthese, da beide intermediäre Schützungen sowie die bisher notwendigen Schutzgruppen transformationen überflüssig machen.

4.3 Konformationsuntersuchungen eines weiteren Turnmimetikums

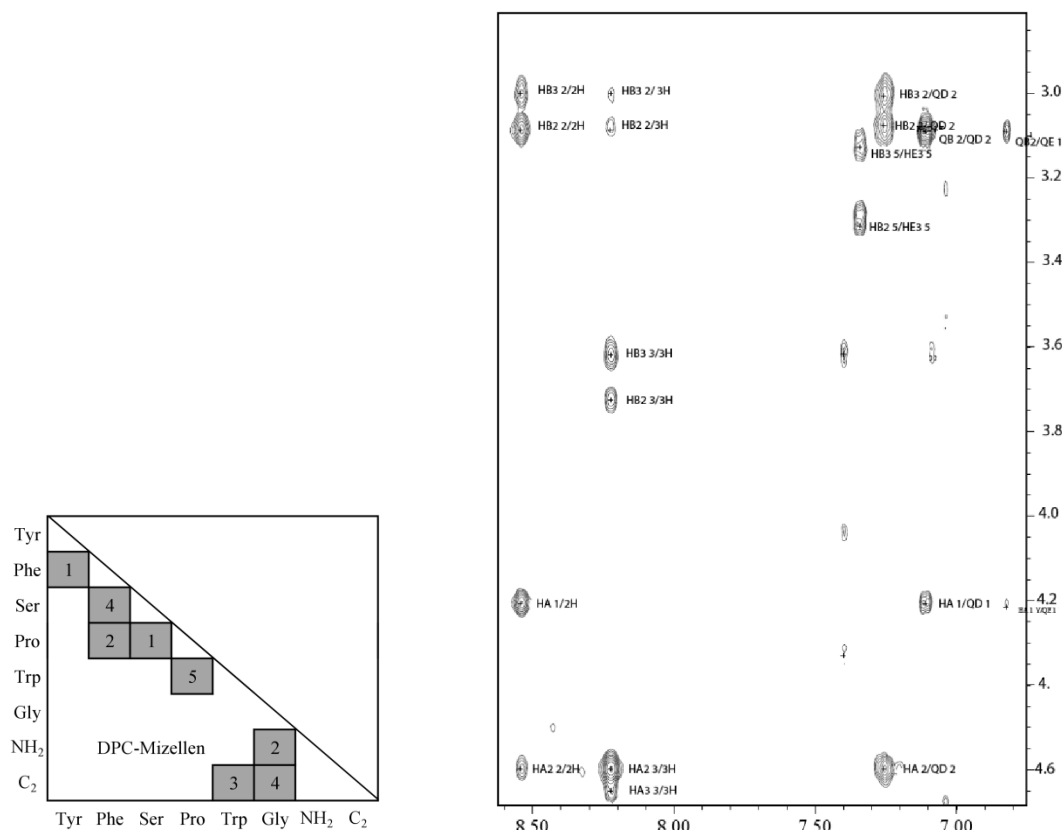
Das in Abschnitt 4.2.2.3 beschriebene Cyclisierungsprodukt **191** stellt aufgrund seiner räumlich fixierten Tryptophan-Seitenkette ein interessantes Analogon des Dipeptids Trp-Gly-NH₂ dar und wurde mittlerweile von C. van Tran in das Helicokinin I integriert.

Abb. 67: Helicokinin I-Analogon mit einer sterisch fixierten Tryptophan-Seitenkette



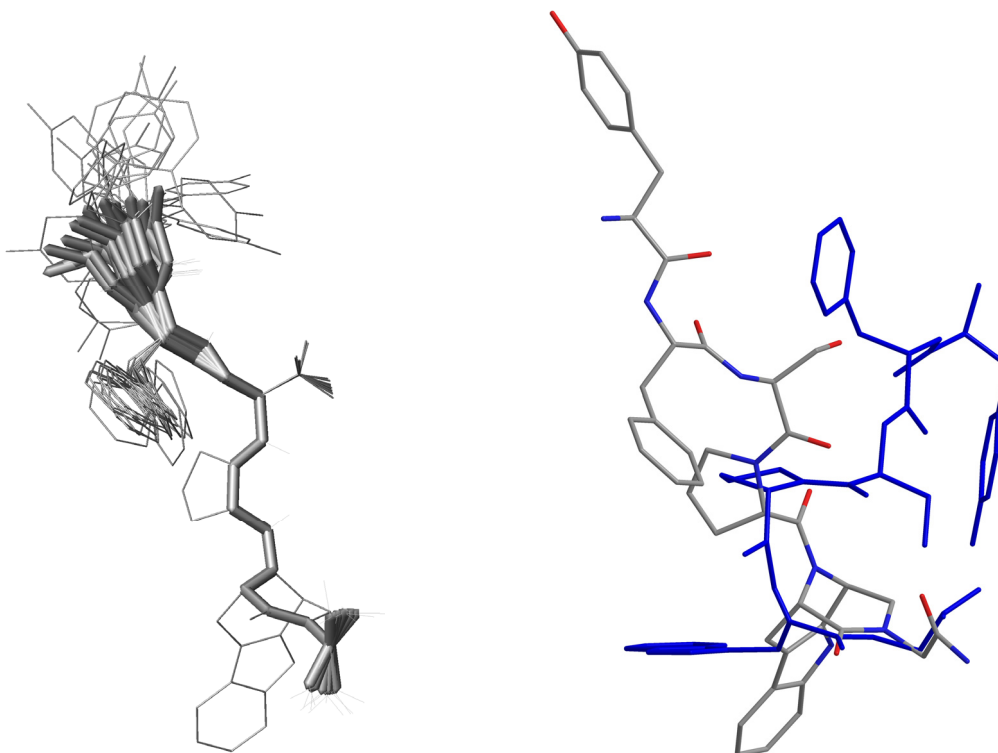
Im Rezeptor-Assay erwies sich das Analogon **254** als unwirksam. Zur Aufklärung der Ursache für die vollständige Wirkungslosigkeit wurde das Peptid **254** an DPC-Mizellen vermessen.

Abb. 68: Anzahl der signifikanten interresiduellen NOEs von **254** in DPC-Mizellen (links); NOESY-Spektrum im Bereich der sequenziellen Amid-Protonen (rechts).



Verglichen mit membrangebundenem Helicokinin I nimmt das Peptid **254** eine deutlich unterschiedliche Konformation in DPC-Mizellen ein. Verursacht wird dies durch die *cis*-Amid-Bindung zwischen Tryptophan und Prolin (bezogen auf das Peptid-Rückgrat). Dadurch wird die Bildung des wichtigen β -Turns unterbunden. Zusätzlich besitzt die Phenylalanin-Seitenkette eine geänderte räumliche Orientierung was gemäß den Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen ebenfalls zu einem Verlust der Rezeptor-Aktivierung führt (Abb. 69). Ein dritter Faktor ist die starre Fixierung der Indol-Seitenkette. Dadurch wird zum einen die Flexibilität und eine damit verbundene Anpassung an den Rezeptor verhindert. Zum anderen ist es möglich, dass diese Orientierung des Indol-Systems nicht geeignet ist um eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rezeptor einzugehen. Die Relevanz des Indols für die Rezeptor-Aktivierung wurde bereits durch das [Phe⁵]-Helicokinin I (**51**) deutlich belegt. In der Summe führen alle drei genannten Parameter zur Inaktivität des Peptids **254**, wobei jeder einzelne Faktor wahrscheinlich eine stark reduzierte Wirkung bzw. vollständige Wirkungslosigkeit im Rezeptor-Assay hervorruft.

Abb. 69: Struktur des Helicokinin I-Analogons **254** in DPC-Mizellen (links), Overlay von **254** mit Membrangebundenen Helicokinin I (blau, rechts)



V Zusammenfassung und Ausblick

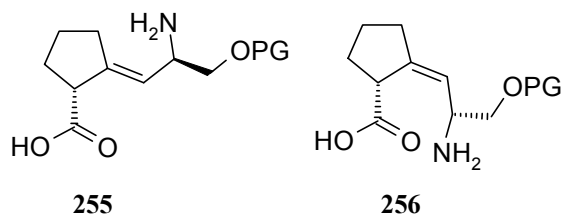
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein valides Bindungsmodell des Insektenneuropeptids Helicokinin I (**5**) am Helicokinin-Rezeptor des ökonomisch relevanten Schadinsekts *Heliothis virescens* entwickelt. Hierfür wurden zunächst Deletions-, L-Aminosäure-, D-Aminosäure- und N-Methyl-Aminosäure-Scans durchgeführt und verschiedene weitere Derivate synthetisiert. Anschließend wurden aus den Daten umfassende Struktur-Wirkungs-Beziehungen für das Helicokinin I erarbeitet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Glycin-Amid die pharmakophoren Einheiten des Helicokinin I darstellen, während die mittleren Aminosäuren Prolin und Serin eher als Spacer zu betrachten sind. Mit Hilfe von NMR-Konformationsuntersuchungen des Helicokinin I und ausgewählter linearer Analoga an artifiziellen Membranen wurde eine Hypothese bezüglich der rezeptorgebundenen Konformation des Helicokinin I aufgestellt. Dieses bildet einen C-terminalen I β -Turn bestehend aus den Aminosäuren Ser³-Pro⁴-Trp⁵-Gly⁶ aus. Spin-Label-Untersuchungen weisen auf eine Verankerung an der Membran hauptsächlich durch die Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan hin, die ebenfalls unverzichtbar für eine erfolgreiche Rezeptoraktivierung sind. Die durch Konformationsanalysen erarbeitete Hypothese steht mit den Struktur-Aktivitäts-Daten im Einklang. Weiterhin wurden Konformationsanalysen der Insektenneuropeptide Tachykinin (**4**) und Myosuppressin (**3**) durchgeführt. Im Fall des Tachykinins war die Ermittlung einer Vorzugskonformation nicht möglich. Das Myosuppressin hingegen bildet eine α -helikale Struktur aus, die von den Spin-Label Experimenten gestützt wird. Diese Vorzugskonformation kann als potenzielle Leitstruktur für zukünftige *Anopheles*-selektive Insektizide dienen. Ein „Conformational-Design“ basierend auf „Head-to-Tail“-cyclisierten Analoga ist für das Helicokinin I aufgrund der nahezu vollständigen Unwirksamkeit aller synthetisierten Cyclopeptide nicht anwendbar. Konformationsanalysen belegten eine geänderte räumliche Orientierung des pharmakophoren Phenylalanins als Hauptursache für die fehlende Rezeptor-Aktivierung. Als Angriffspunkte für zukünftige Cyclisierungen sind besonders der N-Terminus und die Hydroxygruppen des Tyrosins und des Serins geeignet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde das auf Modelling-Untersuchungen basierende, nicht literaturbekannte bicyclische Turnmimetikum **84** ausgehend von enantiomerenreinen Edukten synthetisiert. Die Darstellung des Helicokinin I-Derivats **145** aus dem Bicyclus **84** war nicht möglich, wurde jedoch nach intensiver Optimierung aus der monocyclischen Vorstufe **128** erreicht. Das Helicokinin I-Analogon **145** erwies sich als unwirksam im Rezeptor-Assay. Konformationsuntersuchungen belegten eine räumliche Orientierung aller

pharmakophor relevanten Seitenketten die denen des membrangebundenen Helicokinin I entsprechen. Somit kommt als Hauptursache für die fehlende Rezeptor-Aktivierung die Inflexibilität des bicyclischen Ringsystems in Betracht. Zu Vergleichszwecken wurden die ebenfalls nicht in der Literatur beschriebenen Methyl- sowie Isopropyl-substituierten 1,4,7-Triazonan-2,5-dione **236** und **215** sowie das 11-gliedrige 1,4,6-Triazacycloundec-9-en-2,5-dion **166** synthetisiert. Der Einbau in das Helicokinin I konnte im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation nicht vollständig durchgeführt werden. Bei beiden Grundgerüsten scheiterte die Reaktionssequenz an der schwierigen Anknüpfung des *N*-terminalen Tripeptids oder nachfolgenden unerwarteten Cyclisierungen. Diese Probleme könnten in zukünftigen Arbeiten durch die Cyclisierung zum 9- bzw. 11-gliedrigen Makrocyclus nach dem Aufbau der vollständigen Peptidkette umgangen werden. Diese Synthesestrategie wurde bereits bei der Herstellung des bicyclischen Helicokinin I-Analogons **145** erfolgreich angewendet.

Das optimale Templat für weitere β -Turn-Mimetika wäre natürlich die rezeptorgebundene Konformation des Helicokinin I. Für Ligand-Rezeptor Studien mittels NMR ist sowohl vollständig ^{13}C -markiertes Peptid als auch der isolierte Rezeptor notwendig. Durch den hohen technischen Aufwand, das nötige Equipment und das nötige Know-how in den Bereichen Chemie, Biologie, Biochemie, NMR-Analytik und Konformationsbestimmungen mittels computergestützter Methoden ist hierfür eine intensive Zusammenarbeit von Arbeitsgruppen oben genannter Teildisziplinen notwendig.

Komplementär zu dem in dieser Arbeit verwendeten sekundärstrukturmimetischen Ansatz verspricht ein substratmimetischer Ansatz, bei dem nicht eine Vorzugskonformation sondern die Aminosäuresequenz als Vorbild für Mimetika genutzt wird, vielversprechend zu sein. Eine Fixierung der Tryptophan-Seitenkette erscheint in diesem Fall wenig praktikabel, da die für eine erfolgreiche Rezeptor-Aktivierung notwendige Konformation des Indolrests bisher nicht bekannt ist. Tryptophan-Analoga die eine gewisse Flexibilität der Tryptophan-Seitenkette ermöglichen sollten in Zukunft vorrangig Verwendung finden. Erwähnenswert ist, dass sich der an artifiziellen Membranen ermittelte *trans*Pro I β -Turn über die Aminosäuren Ser-Pro-Trp-Gly deutlich von dem von Nachman, basierend auf Strukturrechnungen, für die Kinine postulierten *cis*Pro VI β -Turn über die Aminosäuren Phe-X_{AA}-Pro-Trp unterscheidet. Die Ergebnisse der Konformationsanalysen des Helicokinin I sowie der linearen und cyclischen Helicokinin I-Analoga sind konsistent mit den biologischen Daten des Rezeptor-Assays, jedoch kann eine Konformationsänderung während der Rezeptorbindung nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Weitere Einsichten in die Konfiguration der Ser-Pro-Bindung sind durch den Ersatz des Dipeptids durch geeignete Mimetika möglich. Neben den von

Abb. 70: Dipeptidmimetika mit isostere Austausch der Ser-Pro-Amidbindung.

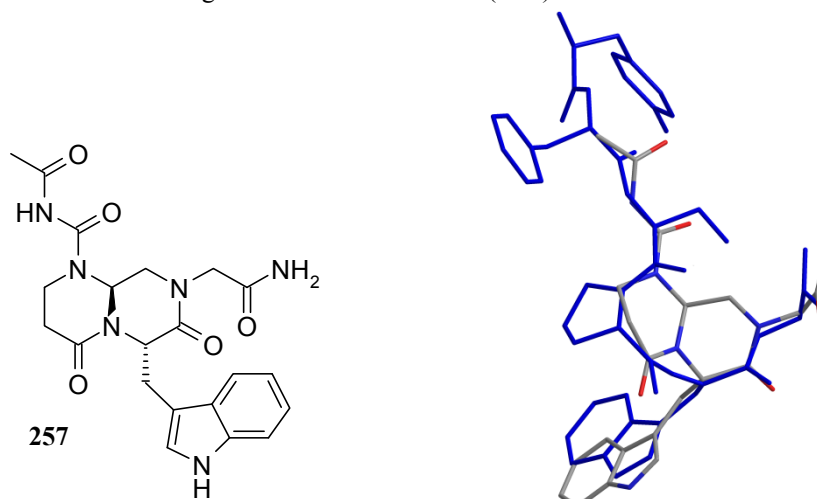


Nachman verwendeten Tetrazolen und Amino-pyroglyutamaten verspricht besonders der isostere Austausch der Amidbindung gegen ein Olefin (Abb. 70) eine zweifelsfreie Aufklärung der Ser-Pro-Konfiguration im rezeptorgebundenen Zustand. Das Dipeptidmimetikum **255**

wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung der Prolin-Konfiguration in PBAN-Analoga am HevPBANR-Rezeptor von *Heliothis virescens* verwendet.^[322]

Zusätzlich ist die Entwicklung passgenauerer Turn-Mimetika ein probates Mittel in der Peptidchemie. Neben dem Einbau der bereits synthetisierten, flexibleren Mimetika **215** und **166** sind auch vom Bicyclus **145** abgeleitete Derivate interessant, die hinsichtlich der Orientierung der Tripeptidkette optimiert sind. Besonders im Bereich der C-terminalen Aminosäuren Trp und Gly-NH₂ zeigte der Cyclus **145** eine ausgesprochen gute Übereinstimmung mit dem membrangebundenen Helicokinin I. Basierend auf der Konformation des Cyclus **145** ist besonders Cyclus **257** interessant, da er zusätzlich zum korrekten Abstand der pharmakophoren Gruppen eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Backbone des Helicokinin I zeigt.

Abb. 71: Struktur eines passgenauen alternativen Peptidomimetikums **257** und Überlagerung dessen energienimierter Struktur mit dem membrangebundenen Helicokinin I (blau)



Zusammenfassend ist zu sagen, dass auf dem Gebiet der Insektenneuropeptide noch erheblicher Forschungsbedarf besteht. Nach der Synthese biologisch aktiver Analoga sind weitere Optimierungen hinsichtlich wichtiger anwendungstechnischer Parameter wie Löslichkeit in Wasser, Stabilität und Resorptionsvermögen notwendig.

VI Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben

1.1 Verwendete Geräte und Reagenzien

Die eingesetzten Reagenzien wurden kommerziell erworben und direkt eingesetzt. THF, Et₂O und Dioxan wurden über LiAlH₄ getrocknet und anschließend destilliert. MeCN, DCM, DMF, DBU, DBN, TEA, DIPEA, DEA und Pyridin wurden entweder über CaH₂ getrocknet und anschließend destilliert oder durch Filtrieren über eine kurze Säule mit basischem Aluminiumoxid getrocknet. Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgelplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄, 250 µm) der Firma Merck durchgeführt. Die Detektion erfolgte entweder durch UV-Licht (254 nm) oder/und durch Eintauchen in KMnO₄-Lösung und anschließendem Erhitzen mit einer Heißluftpistole. Freie Aminofunktionen wurden mit Ninhydrin-Lösung und anschließendem Erhitzen angefärbt. Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm) der Firma Macherey Nagel durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor am Rotationsverdampfer destilliert. Infrarot-Spektren wurden entweder an einem JASCO FT/IR-4200 oder an einem Nicolet Protégé 460 Spectrometer E.S.P. gemessen. Die GC-MS-Spektren wurden mit einem Shimadzu GC-17A und daran gekoppeltem Shimadzu GCMS-QP 5050 A aufgenommen. Für die GC wurden die Kapillarsäulen FS-OV-1-CB 0.25 (l = 25 m) und Optima-1-Accent-0.25 (l = 25 m) verwendet. HPLC-MS-Spektren wurden mit den Geräten Varian 500 IonTrap (LC-ESI-MS System, Säule: RP18, 5 µm) oder Bruker MicrOTOF (LC-ESI-MS System) auf einer C₁₈-Säule der Firma MZ Analystechnik (PerfectSil Target ODS-3 HD 5µm, 100*4.6 mm) aufgenommen. Die für die Peptidanalytik im Abschnitt 2.7 und 2.8 aufgeführten Retentionszeiten beziehen sich auf folgenden Gradienten:

Zeit (min)	Wasser (%)	Acetonitril (%)	Fluss (mL/min)
0	90	10	1.5
14	5	95	1.5
22	5	95	1.5

Für die hochaufgelösten Massenspektren wurde das Bruker MicrOTOF verwendet. Semipräparative HPLC-Trennungen wurden mit den beiden Säulen Grace Vydac (Cad: 218TP510 Protein&Peptide C18, 5µm) oder LiChroCART® (250-10, Cat: 50853, Lichrospher® 100 RP-18) an einem Gilson Abimed System durchgeführt. NMR-Spektren wurden mit den Geräten Bruker Avance 400 (¹H: 400.13 MHz, ¹³C: 100.62 MHz) oder Bruker Avance 600 (¹H: 600.13 MHz, ¹³C: 150.90 MHz) bei 25 °C mit Tetramethylsilan als internem Standard aufgenommen. Kopplungskonstanten beziehen sich, wenn nicht anders aufgeführt, auf zwei Protonen und sind in Hz angegeben. Aufgrund der Amidresonanz tertiärer Amide und Carbamate ist die Auswertung einiger ¹H-NMR-Spektren und ¹³C-NMR-Spektren unmöglich. Bei einer genauen Zuordnung wird das Verhältnis der Isomere bei der Abhandlung der analytischen Daten aufgeführt. Die Nummerierung der Moleküle dient der anschaulichen Zuordnung der Signale und erfolgte nicht nach IUPAC Die verkürzten Helicokinin-Analoga **25-31**, die Alanin-Analoga **32-37** und die D-Aminosäure-Analoga **36-42** wurden kommerziell erworben und im Rezeptor-Assay untersucht.

1.2 Abkürzungen

5-Dox, 5-Doxylstearinsäure; AA, Aminosäure; Ac, Acetyl; Alb, β -(4'-Hydroxy-2'-benzoyl)alanin; Ald, β -[6'-(*N,N*-dimethyl-amino-2'-naphthoyl)]alanin; BEP, 2-Brom-1-ethyl-pyridinium-tetrafluorborat; Bn, Benzyl; Boc, tert-Butyloxycarbonyl; BOP-Cl, Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphorsäurechlorid; Bpa, Bispicolylamin; BTFFH, Fluordipyrrolidinocarbeniumhexafluorophosphat; Cbz, Benzyloxycarbonyl; CH, Cyclohexan; DBU; 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; DCM, Dichlormethan; DEA, *N,N*-Diethylamin; DEAD, Azodicarbonsäurediethylester; DIPEA, *N,N*-Diisopropylethylamin; DMBA, 2,4-Dimethoxybenzylamin; DMF, *N,N*-Dimethyl-formamid; DMSO, Dimethylsulfoxid; DPC; Dodecylphosphocholin; EDC, 3-(Ethyliminomethylidenamino)-*N,N*-dimethyl-propan-1-amin; EE, Essigester; Fmoc, Fluorenylmethoxycarbonyl; GDP, Guanosindiphosphat; GPCR, G-Protein gekoppelter Rezeptor; HATU, *N,N,N,N*-Tetramethyl-*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphat; HOAt, 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole; HOBT, 1-Hydroxybenzotriazol; *iPr*, *iso*-Propyl; LiDMA, Lithiumdimethylamid; LG, Leaving Group; Me, Methyl; MeCN, Acetonitril; Mes, Mesyl; NOE, Nuclear Overhauser Effekt; Nos, 2-Nitronenzylsulfonyl; *oTol*, *ortho*-Tolyl; Pbf, 2, 2', 4, 6, 7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl; PCy₃, Tricyclohexylphosphin; PG, Protecting Group; Ph, Phenyl; PyBOP, (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat; PyBrOP, Brom-trispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat; PMB, *para*-Methoxybenzyl; RCM, Ringschlussmetathese; RT, Raumtemperatur; SDS, Natriumdodecylsulfat; TBAF, Tetra-*n*-butylammoniumfluorid; TBDMS, *tert*-Butyldimethylsilyl; TBDPS, *tert*-Butyldiphenylsilyl; TBTU, *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluronium tetrafluorborat, *tBu*, *tert*-Butyl; TEA, Triethylamin; Tf, Triflyl; TFA, Trifluoressigsäure; TFE, 2,2,2-Trifluorethanol; THF, Tetrahydrofuran; TIS, Triisopropylsilan; Tos, Tosyl; TPP, Triphenylphosphin; Trt, Trityl.

1.3 Durchführung der biologischen Tests

Die biologischen Tests wurden von der Firma Bayer wie folgt durchgeführt. Der Helikokinin-Rezeptor (HKR) von *Heliothis virescens* wurde ausgehend von einer malpighischen-Gefäß cDNA-Bibliothek kloniert und zeigte etwa 50 % Aminosäure-Homologie zum Leukokinin-Rezeptor von *Lymnea stagnalis*.^[121,323] Der Helicokinin Rezeptor wurde in chinesischen Hamster Ovarienzelllinien exprimiert. Der Rezeptor war funktionell über G-Proteine in eine Second-Messenger-Kaskade integriert. Die Aktivierung des HKR wurde in lebenden Zellen über Messung des induzierten Calcium-Ionenflusses in das Zytosol analysiert.^[324,325] Calciumionen sensitive Farbstoffe der Firma Molecular Devices wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden in 384-Well Mikrotiterplatten (4*10³ Zellen pro Well) platziert und über Nacht (37 °C, 5% CO₂) inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur innerhalb von 10 Minuten wurden die Zellen mit 50 μ l HBSS (Hank's balanced salt solution) gewaschen. Anschließend wurde das Medium durch den Calcium-sensitiven Farbstoff in HBBS (50 μ l) ersetzt und die Zellen in der Dunkelheit für 1 h beladen. Danach wurden die Mikrotiterplatten an einem Flexstation Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader (Molecular Devices) ausgelesen. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm, die Emissionswellenlänge 525 nm. Messungen wurden über eine Zeitdauer von 100 s im Abstand von 2.7 s durchgeführt. Zur Messung der agonistischen Aktivität wurde für 15-30 s eine Background-Messung durchgeführt, gefolgt von Zugabe der Testsubstanz (25 μ l). Die Helicokinine I und II wurden als interner Standard in vier unabhängigen Experimenten vermessen. Die EC₅₀-Werte wurden basierend auf der konzentrationsabhängigen Induktion des Calciumionenflusses berechnet. Die Berechnung erfolgte mit der Software Softmax-Pro 5.0 (Molecular Devices) nach Subtraktion F_{min} (Basislinie) von F_{max} (maximales agonistisches Signal). Alle Testsubstanzen wurden in zwei unabhängigen Experimentreihen und 10 Verdünnungsschritten von 0.5 nM bis 10 μ M vermessen.

2. Vorschriften zur Festphasensynthese der Peptide

2.1 Chloraniltest auf freie Aminofunktionen

Wenige Beads werden mit Acetaldehyd (Test auf primäre Aminofunktionen) oder Aceton (Test auf sekundäre Aminofunktionen) versetzt und dazu ein paar Tropfen Chloranil gelöst in Toluol gegeben. Eine Blaufärbung innerhalb von 5 Minuten zeigt das Vorhandensein freier Aminofunktionen an. (Zu Beachten ist, dass bei getrocknetem Harz eine längere Zeit zu warten ist, da das Polymer einige Zeit zum Quellen benötigt.)

2.2 Bestimmung des Beladungsgrades eines Harzes

Die Bestimmung der Beladung erfolgt nach folgenden Schritten:

- 10-15 mg im HV getrocknetes Harz werden in ein HPLC-Vial überführt.
- Dazu werden 3 Tropfen Piperidin und 7 Tropfen Dichlormethan gegeben und das Gemisch für 30 Minuten geschüttelt.
- Anschließend wird die Lösung in einen 25 mL Kolben gefiltert und das Harz zweimal mit 200 µl DCM nachgewaschen.
- Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.
- Der Rückstand wird mit 1-2 mL *t*BuOH/H₂O (1:1) versetzt und kurz ins Ultraschallbad gegeben. Anschließend wird das Gemisch lyophilisiert.
- Der erhaltene Feststoff wird in 10 mL DCM gelöst, 1 mL mit einer Transferpipette in einen 10 mL Messkolben überführt und mit 9 mL DCM aufgefüllt.
- Die Lösung wird in eine UV-Küvette überführt und die Extinktion bei 301 nm ($\epsilon = 7800$), 290 nm ($\epsilon = 5800$) und 267 nm ($\epsilon = 17500$) gemessen.
- Die Beladung wird über folgende Gleichung berechnet:

$$x \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Extinktion} * 100000}{\epsilon * m(\text{mg})}$$

und ergibt sich aus den Mittelwerten der drei ermittelten Beladungen $x(\text{mmol/g})$.

2.3 Synthese linearer Peptidamide

Das Rink-Amid Harz (0.68 mmol/g) wird in DMF (10 mL/g Harz) für 15 Minuten gequollen. Anschließend wird der Überschuss an Lösungsmittel durch Filtration entfernt. Die Fmoc-Gruppe wird durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit einer 30%igen Lösung von Piperidin in DMF für jeweils 15 Minuten entfernt. Die Anbringung der Aminosäuren erfolgt durch zweifache Kupplung (2x 10 h) unter Verwendung eines 2.5fachen Überschusses der Fmoc-Aminosäure und PyBOP und einen 5fachen Überschuss an DIPEA. Für die Kupplung an *N*-Methyl-Aminosäuren wird HATU (2.5facher Überschuss) als Kupplungsreagenz verwendet. Nach jedem Kupplungsschritt sowie jeder Fmoc-Spaltung wird das Harz ausgiebig mit DMF (5x), MeOH (3x) und DCM (5x) gewaschen. Die Vollständigkeit der Kupplung wird mit dem Chloraniltest überprüft. Zur Abspaltung der Peptide wird getrocknetes Harz mit einer Mischung aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (95/2.5/2.5) versetzt und für 2 h geschüttelt. Nach Filtration und Wiederholung des Abspaltschrittes wird das Harz intensiv mit DCM (5x) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden eingeeengt, mit Wasser/Acetonitril versetzt und lyophilisiert. Die Rohprodukte werden mittels präparativer HPLC gereinigt und durch HPLC-ESI-MS analysiert.

2.4 Synthese linearer seitenkettengeschützter Peptidsäuren

2-Chlortritylchlorid Harz (1.3 mmol/g) wird für 30 Minuten vorgequollen. Nach Filtration wird das Harz mit 5 Äquivalenten der Fmoc-Aminosäure und 10 Äquivalenten DIPEA in DMF versetzt und 3 h geschüttelt. Nach Filtration und Waschen mit DMF wird der Kupplungsschritt wiederholt. Zum Quenchen reaktiver Chloratome wird das Harz für 30 Minuten mit einer Mischung aus DIPEA/MeOH/DCM (1:1:5) versetzt. Anschließend wird das Harz gründlich mit DMF (5x), MeOH (3x) und Dichlormethan (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Der Erfolg der Anbringung der ersten Aminosäure wird durch die Beladungsbestimmung mittels Fmoc-Abspaltung ermittelt (Vorschrift 2.2). Anschließend wird das Harz erneut 30 Minuten in DMF vorgequollen, gefolgt von Spaltung der Fmoc-Gruppe (30 % Piperidin in DMF, 15 Minuten, 2x). Der Aufbau der Peptide erfolgt durch zweifache Kupplung (2x 10 h) von 2.5 Äquivalenten der Aminosäure und PyBOP sowie 5 Äquivalente DIPEA. Nach jedem Kupplungsschritt sowie jeder Fmoc-Spaltung wird das Harz ausgiebig mit DMF (5x), MeOH (3x) und DCM (5x) gewaschen. Die Vollständigkeit der Kupplung wird mit dem Chloraniltest überprüft. Die Abspaltung der seitenkettengeschützten Peptide erfolgt nach Vorquellen in DCM (30 Minuten) durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit einer Mischung aus AcOH/TFE/DCM (1/1/3) für 2 h. Die Spalt- und Waschlösungen (TFE/DCM, 1:4, 5x) werden vereinigt, eingeengt, mit Wasser/Acetonitril versetzt und lyophilisiert. Die Rohprodukte werden mittels HPLC-ESI-MS analysiert.

2.5 Synthese cyclischer Helicokinin-Analoga

TBTU/HOBt/DIPEA (3:3:5 Äquivalente) werden in DCM (0.5 mL/mg Peptid, 2% DMF) gelöst. Anschließend werden die linearen seitenkettengeschützten Peptide gelöst in DCM (1 mL/mg Peptid) langsam über eine Dauer von 2 h zugetropft. Der Umsatz der Reaktion wird mittels HPLC-MS verfolgt. Nach 4 h wird die Reaktionsmischung mit 0.1 M HCl gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Seitenkettenschutzgruppen werden durch Umsetzung mit TFA/TIS/H₂O = 95/2.5/2.5 (10 mL/100 mg Peptid, 2 h, 0 °C) entfernt. Überschüssiges TFA wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril (1/1) gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC gereinigt und mittels HPLC-MS charakterisiert.

2.6 Synthese des Monomethyl- und Dimethylpeptidamids

DIPEA (60 Äq.) und EDC·HCl (3 Äq.) werden in Chloroform (2 mL/mg Peptid) gelöst und Methylamin-Hydrochlorid (45 Äquivalente) oder Dimethylamin-Hydrochlorid (45 Äquivalente) hinzugefügt. Anschließend wird die lineare seitenkettengeschützte Peptidsäure (Tyr(*t*Bu)-Phe-Ser(*t*Bu)-Pro-Trp-Gly-OH **71**) gelöst in Chloroform (0.8 mL/mg Peptid) langsam innerhalb von 2 h zugetropft. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 24 h wird das Reaktionsgemisch mit Wasser gewaschen und das Chloroform unter vermindertem Druck entfernt. Die Seitenkettenschutzgruppen werden durch Umsetzung mit TFA/TIS/H₂O = 95/2.5/2.5 (10 mL/100 mg Peptid, 2 h, 0 °C) gespalten. Danach wird TFA unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril (1/1) gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC gereinigt und mittels HPLC-MS charakterisiert.

2.7 Übersicht aller mittels Festphasensynthese hergestellten Neuropeptide und Analoga

	Sequenz	Summenformel	HPLC-ESI-MS	HR-ESI-MS	Synthese
5²⁾ (TZD-062)	Helicokinin I Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	C ₃₉ H ₄₆ N ₈ O ₈	R _t = 6.4 min 755.4 [M+H] ⁺	berechnet: 755.3511 gefunden: 755.3513	2.3
3²⁾ (TZD-065)	Myosuppressin Thr-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂	C ₅₈ H ₈₆ N ₁₆ O ₁₅	R _t = 7.5 min 1247.4 [M+H] ⁺	berechnet: 1247.6531 gefunden: 1247.6533	2.3
4²⁾ (TZD-081)	Tachykinin Ala-Pro-Leu-Ser-Gly-Phe-Tyr-Gly-Val-Arg-NH ₂	C ₅₀ H ₅₆ N ₁₄ O ₁₂	R _t = 6.8 min 1065.6 [M+H] ⁺	berechnet: 1065.5840 gefunden: 1065.5839	2.3
38 (TZD-103)	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NHMe	C ₄₀ H ₄₈ N ₈ O ₈	R _t = 6.5 min 769.4 [M+H] ⁺	berechnet: 791.3487 ¹⁾ gefunden: 791.3487 ¹⁾	2.6
39 (TZD-104)	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NMe ₂	C ₄₁ H ₅₁ N ₈ O ₈	R _t = 6.7 min 783.4 [M+H] ⁺	berechnet: 783.3824 gefunden: 783.3828	2.6
40 (TZD-114)	Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-NMeGly-NH ₂	C ₄₀ H ₄₈ N ₈ O ₈	R _t = 7.3 min 769.3 [M+H] ⁺	berechnet: 769.3668 gefunden: 769.3666	2.3
41 (TZD-115)	Tyr-Phe-Ser-Pro-NMeTrp-Gly-NH ₂	C ₄₀ H ₄₈ N ₈ O ₈	R _t = 7.4 min 769.4 [M+H] ⁺	berechnet: 791.3487 ¹⁾ gefunden: 791.3488 ¹⁾	2.3
42 (TZD-116)	Tyr-Phe-NMeSer-Pro-Trp-Gly-NH ₂	C ₄₀ H ₄₈ N ₈ O ₈	R _t = 7.1 min 769.5 [M+H] ⁺	berechnet: 769.3668 gefunden: 769.3665	2.3
43 (TZD-117)	Tyr-NMePhe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	C ₄₀ H ₄₈ N ₈ O ₈	R _t = 7.4 min 769.3 [M+H] ⁺	berechnet: 769.3668 gefunden: 769.3667	2.3
44 (TZD-118)	NMeTyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂	C ₄₀ H ₄₈ N ₈ O ₈	R _t = 7.2 min 769.5 [M+H] ⁺	berechnet: 769.3668 gefunden: 769.3669	2.3
51 (TZD-112)	Tyr-Phe-Ser-Pro-Phe-Gly-NH ₂	C ₃₇ H ₄₅ N ₇ O ₈	R _t = 7.6 min 716.3 [M+H] ⁺	berechnet: 716.3402 gefunden: 716.3407	2.3

¹⁾[M+Na]⁺²⁾Diese Verbindungen wurden an artifiziellen Membranen vermessen (siehe S. 175)

2.8 Übersicht aller hergestellten Cyclopeptide und Vorstufen

	Sequenz	Summenformel	HPLC-ESI-MS	HR-ESI-MS	Synthese
71 (TZD-086)	Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-Pro-Trp-Gly-OH	C ₄₇ H ₆₁ N ₇ O ₉	R _t = 7.6 min 868.5 [M+H] ⁺	berechnet: 890.4423 ¹⁾ gefunden: 890.4420 ¹⁾	2.4
(TZD-089)	Val-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-Pro-Trp-Gly-OH	C ₅₂ H ₇₀ N ₈ O ₁₀	R _t = 7.9 min 967.5 [M+H] ⁺	berechnet: 989.5107 ¹⁾ gefunden: 989.5107 ¹⁾	2.4
(TZD-092)	Gly-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-Pro-Trp-Gly-OH	C ₄₉ H ₄₆ N ₈ O ₁₀	R _t = 8.1 min 925.5 [M+H] ⁺	berechnet: 947.4635 ¹⁾ gefunden: 947.4638 ¹⁾	2.4
(TZD-095)	Gly-Gly-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-Pro-Trp-Gly-OH	C ₅₁ H ₆₇ N ₉ O ₁₁	R _t = 7.8 min 982.5 [M+H] ⁺	berechnet: 982.5033 gefunden: 982.5030	2.4
(TZD-098)	Gly-Gly-Gly-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Ser(<i>t</i> Bu)-Pro-Trp-Gly-OH	C ₅₃ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₂	R _t = 7.6 min 1039.6 [M+H] ⁺	berechnet: 1039.5247 gefunden: 1039.5242	2.4
63 ²⁾ (TZD-088)	<i>cyclo</i> (Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly)	C ₃₉ H ₄₃ N ₇ O ₈	R _t = 7.4 min 738.3 [M+H] ⁺	berechnet: 760.3065 ¹⁾ gefunden: 760.3071 ¹⁾	2.5
64 ³⁾ (TZD-091)	<i>cyclo</i> (Val-Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly)	C ₄₄ H ₅₂ N ₈ O ₉	R _t = 7.6 min 837.4 [M+H] ⁺	berechnet: 859.3749 gefunden: 859.3749	2.5
65 ³⁾ (TZD-094)	<i>cyclo</i> (Gly-Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly)	C ₄₁ H ₄₆ N ₈ O ₉	R _t = 7.1 min 795.4 [M+H] ⁺	berechnet: 817.3280 ¹⁾ gefunden: 817.3278 ¹⁾	2.5
66 ³⁾ (TZD-097)	<i>cyclo</i> (Gly-Gly-Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly)	C ₄₃ H ₄₉ N ₉ O ₁₀	R _t = 7.0 min 874.4 [M+Na] ⁺	berechnet: 874.3495 ¹⁾ gefunden: 874.3487 ¹⁾	2.5
67 ²⁾ (TZD-100)	<i>cyclo</i> (Gly-Gly-Gly-Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly)	C ₄₅ H ₅₂ N ₁₀ O ₁₁	R _t = 6.8 min 926.4 [M+NH ₄] ⁺	berechnet: 931.3709 ¹⁾ gefunden: 931.3705 ¹⁾	2.5
73 (SEM-026)	Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-Phe-Set(<i>t</i> Bu)-OH	C ₄₄ H ₅₁ N ₃ O ₈	R _t = 9.4 min 750.4 [M+H] ⁺	berechnet: 772.3568 ¹⁾ gefunden: 772.3568 ¹⁾	2.4

¹⁾[M+Na]⁺²⁾Diese Peptide wurden an artifiziellen Membranen vermessen (siehe S. 175)³⁾Aufgrund von Konformerengemischen waren Konformationsanalysen dieser Peptide nicht erfolgreich

2.9 Durchführung der NMR-Untersuchungen an artifiziellen Membranen

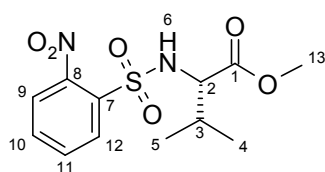
Die NMR-Experimente wurden mit einer 2 mM Lösung der Peptide an DPC oder SDS Mizellen (300 mM) in MES-Puffer (20 mM, pH 5.5) durchgeführt. Dies entspricht einer 5 mM Konzentration an Mizellen.^[326] Alle NMR-Experimente wurden bei dieser hohen DPC-Konzentration weit über der kritischen mizellaren Konzentration von 1.1 mM und diesem Mizell-/Peptidverhältnis deutlich größer eins durchgeführt. Dadurch ist erwiesenermaßen eine deutliche Qualitätsverbesserung der NMR-Spektren möglich.^[327] Die Strukturen wurden basierend auf NOESY-Spektren, aufgenommen mit 100 ms (DPC) bzw. 70 ms (SDS) Mischzeit, berechnet. Zur Interpretation der Spektren und Integration der NOEs wurde die Software XEASY^[156] verwendet. Die Resonanzzuordnung erfolgte nach der von Wüthrich entwickelten sequenziellen Resonanz-Zuordnungs-Prozedur.^[139] Für die Strukturberechnung mit dem Programm Cyana 2.1 wurden oberer Distanzlimits verwendet, die durch Integration der NOEs erhalten wurden.^[159] Aufgrund der Probleme skalarer Kopplungskonstanten in flexiblen Systemen wurde auf die Verwendung von Einschränkungen der Konformation basierend auf Kopplungskonstanten verzichtet. Zunächst wurden 100 Strukturen mit Cyana berechnet. Für die Berechnung wurde das in Cyana implementierte Standard-„Simulated Annealing“-Protokoll mit seinem vereinfachten Kraftfeld in Abwesenheit von Lösungsmittelmolekülen verwendet. Die 20 energieärmsten Strukturen wurden ohne zusätzliche Verfeinerung ausgesucht und repräsentieren das NMR-Ensemble. Die Visualisierung der Strukturen sowie die Extraktionen der dihedralen Winkel wurden mit dem Programm MOLMOL durchgeführt.^[328]

2.10 Spin-Label Experimente

5-Doxylstearat wurde in D₃-MeOH in einer Konzentration von 0.3 M gelöst. Von dieser Lösung wurden Aliquote zur Probe gegeben, so dass eine endgültige Konzentration von 5 mM erhalten wurde. Dies entspricht ungefähr einem Spin-Label pro Mizelle. Die Spektren wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen wie die Spektren ohne Spin-Label. Die Abnahme der Intensität, sowohl der NH_n-H_{αm}-Signale als auch der Seitenketten-signale wurde zur Analyse herangezogen und auf ein Spektrum ohne Spin-Label referenziert.

3. Verbindungen aus Kapitel 4.2.1

3.1 (S)-3-Methyl-2-(2-nitrophenylsulfonamido)butansäuremethylester (96a, TZD-109)

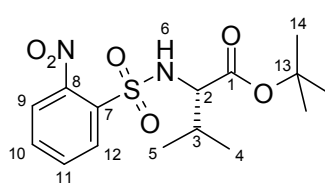


Zu einer eisgekühlten Lösung von L-Valinmethylester-hydrochlorid (5.01 g, 29.8 mmol) und TEA (9.2 mL, 66 mmol) gelöst in DCM (250 mL) wird portionsweise 2-Nitrophenylsulfonsäurechlorid (6.65 g, 30 mmol) hinzugegeben. Die Mischung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Lösung wird mit Wasser (2x 100 mL) gewaschen, die wässrige

Phase mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (DCM). Das Sulfonamid **96a** (8.45 g, 26.7 mmol, 89%) wird als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91, 0.97 (jeweils d, *J* = 6.8 Hz, 6H, 4-H, 5-H), 2.13 (m, 1H, 3-H), 3.41 (s, 3H, 13-H), 3.97 (dd, *J* = 5.4 Hz, *J* = 9.8 Hz, 1H, 2-H), 6.01 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 6-H), 7.68-7.74 (m, 2H, 10-H, 11-H), 7.88 (m, 1H, 12-H), 8.02 (m, 1H, 9-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 17.4, 18.8 (4-C, 5-C), 31.4 (3-C), 52.0 (13-C), 62.0 (2-C), 125.4 (12-C), 130.3 (9-C), 133.0, 133.8 (10-C, 11-C), 133.9 (7-C), 147.5 (8-C), 170.9 (1-C). **IR(Film)**: 3310 (N-H), 1738 (C=O), 1540 (N=O), 1360 (N=O) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 257 (100) [M-CO₂CH₃]⁺, 317 (60) [M+H]⁺, 334 (69) [M+NH₄]⁺, 339 (26) [M+Na]⁺, 655 (37) [2M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: gefunden: 339.0621, berechnet für C₁₂H₁₆N₂NaO₆S⁺: 339.0621. **R_f-Wert**: 0.41 (DCM).

3.2 (S)-3-Methyl-2-(2-nitrophenylsulfonamido)butansäure-*tert*-butylester (96b, TZD-136)

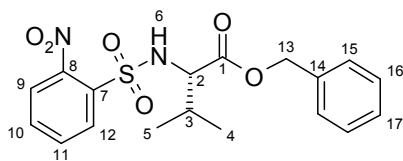


L-Valin-*tert*-butylester-Hydrochlorid (4.94 g, 23.5 mmol) und TEA (6.5 mL, 46.6 mmol) werden in DCM (100 mL) gelöst. Dazu wird bei 0 °C 2-Nitrophenylsulfonsäurechlorid (5.85 g, 26.4 mmol) portionsweise hinzugegeben. Die Mischung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Lösung wird mit Wasser (2x 100 mL) gewaschen und die wässrige

Phase mit DCM (100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (CH/DCM, 3:7) liefert das Sulfonamid **96b** (7.85 g, 21.9 mmol, 93 %) als beiger Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.92 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 4-H), 1.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 5-H), 1.19 (s, 9H, 14-H), 2.12 (m, 1H, 3-H), 3.87 (dd, *J* = 9.8 Hz, *J* = 5.0 Hz, 1H, 2-H), 6.04 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 6-H), 7.70 (m, 2H, 10-H, 11-H), 7.90 (m, 1H, 12-H), 8.06 (m, 1H, 9-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 17.3, 19.0 (4-C, 5-C), 27.6 (14-C), 31.6 (3-C), 62.6 (2-C), 82.3 (13-C), 125.5 (12-C), 130.4 (9-C), 132.8 (11-C), 133.4 (10-C), 134.4 (7-C), 147.8 (8-C), 169.6 (1-C). **IR (KBr)**: 1730 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 257 (100) [M-CO₂-C₄H₉], 303 (57) [M-C₄H₈+H]⁺, 376 (95) [M+NH₄]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 376.1537, berechnet für C₁₅H₂₆N₃O₆S⁺: 376.1537. **R_f**: 0.30 (DCM).

3.3 (S)-3-Methyl-2-(2-nitrophenylsulfonamido)butansäurebenzylester (96c, TZD-138)

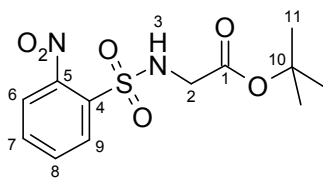


Zu einer eisgekühlten Lösung von L-Valinbenzylester-*p*-toluolsulfonsäuresalz (5.00 g, 13.2 mmol) und TEA (4.06 mL, 29.1 mmol) gelöst in DCM (250 mL) wird portionsweise 2-Nitrophenylsulfonsäurechlorid (2.98 g, 13.4 mmol) hinzugegeben. Die Mischung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die

resultierende Lösung wird mit Wasser (2x 100 mL) gewaschen, die wässrige Phase mit DCM (100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen wird das Rohprodukt mittels Kieselgelchromatographie (CH/EE, 7:3) gereinigt. Das Sulfonamid **96c** (4.61 g, 11.8 mmol, 89 %) wird als grünliches Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 4-H), 1.01 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 5-H), 2.19 (m, 1H, 3-H), 4.06 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, 2-H), 4.85 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 13-H), 4.89 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, 13-H), 6.06 (s, br, 1H, 6-H), 7.15 (m, 2H, 15-H), 7.31 (m, 3H, 16-H, 17-H), 7.56-7.65 (m, 2H, 10-H, 11-H), 7.80 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, 12-H) 7.98 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H, 9-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 17.3, 19.0 (4-C, 5-C), 31.6 (3-C), 62.1 (2-C), 67.0 (13-C), 125.5 (12-C), 128.4, 128.6 (15-C, 16-C, 17-C), 130.2 (9-C), 132.7, 133.5 (10-C, 11-C), 134.1 (7-C), 134.8 (14-C), 147.6 (8-C), 170.4 (1-C). **IR (KBr)**: 3322 (NH), 1739 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: 393 (12) [M+H]⁺, 410 (100) [M+NH₄]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 410.1385, berechnet für C₁₈H₂₄N₃O₆S⁺: 410.1380; *m/z* = 393.1120, berechnet für C₁₈H₁₉N₂O₆S⁺: 393.1115. **R_f**: 0.25 (CH/EE, 7:3).

3.4 2-(2-Nitrophenylsulfonylamido)essigsäure-*tert*-butylester (96d, TZD-129)



Glycin-*tert*-butylester (2.82 g, 21.5 mmol) und TEA (6 mL, 43 mmol) werden in DCM/DMF (250 mL/1 mL) gelöst. Dazu wird bei 0 °C 2-Nitrophenylsulfonsäurechlorid (4.91 g, 22.2 mmol) in mehreren Portionen hinzugegeben. Das Gemisch wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 16 h gerührt. Anschließend wird mit Wasser (2x 100 mL) gewaschen und die vereinigten

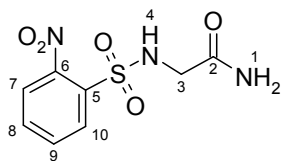
wässrigen Phasen mit DCM (100 mL) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung mit DCM liefert das Sulfonamid **96d** (5.12 g, 16.2 mmol, 75 %) als blassgelben Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.31 (s, 9H, 11-H), 3.88 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, 2-H), 6.00 (ψs, 1H, 3-H), 7.69-7.75 (m, 2H, 7-H, 8-H), 7.90 (m, 1H, 9-H), 8.07 (m, 1H, 6-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 16.3 (11-C), 45.6 (2-C), 94.3 (10-C), 125.6 (9-C), 130.6 (6-C), 132.8 (7-C), 133.6 (8-C) 134.0 (4-C), 147.9 (5-C) 167.4 (1-C). **IR (KBr)**: 3339 (NH), 1727 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 261 (38) [M-C₄H₈+H]⁺, 334 [M+NH₄]⁺, 650 (29) [2M+NH₄]⁺. **HR-ESI-MS**: gefunden: 339.0621, berechnet für C₁₂H₁₆N₂NaO₆S⁺: 339.0621. **R_f**: 0.24 (DCM).

3.5 2-(2-Nitrophenylsulfonamido)acetamid (96e, TZD-113)

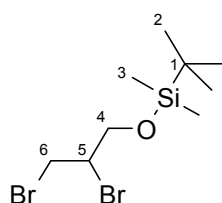
Zu einer eisgekühlten Suspension von Glycinamid-Hydrochlorid (5.03 g, 45.5 mmol) und TEA (14 mL, 100 mmol) in DCM/DMF (250 mL/1 mL) wird bei 0 °C 2-Nitrophenylsulfonsäurechlorid (10.07 g, 45.4 mmol) hinzugegeben. Die Suspension wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 16 h gerührt. Anschließend wird

der entstandene Feststoff abgesaugt und mit DCM (3x 50 mL) nachgewaschen. Nach Umkristallisation aus Wasser-Ethanol wird das Sulfonamid **96e** (8.72 g, 31.9 mmol, 70 %) als schwachgrüner Feststoff erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ = 3.56 (s, 2H, 3-H), 7.04, 7.28 (2x s, 2H, 1-H), 7.78-7.82 (m, 2H, 8-H, 9-H), 7.91-7.94 (m, 1H, 10-H), 8.01-8.03 (m, 1H, 7-H), 8.09 (s, 1H, 4-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₆-DMSO): δ = 44.90 (3-C), 124.4 (10-C), 129.7 (7-C), 132.6, 132.9 (8-C, 9-C), 133.9 (5-C), 147.5 (6-C), 169.2 (2-C). **IR**: 1706 (CO), 1375, 1165 (SO₂) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 186 (37) [M-NHCH₂CONH₂]⁺, 215 (19) [M-CONH₂]⁺, 260 (100) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 282.0155 berechnet für C₈H₉N₃NaO₅S⁺: 282.0155. **R_f**: Wert: 0.23 (EE-EtOH, 15:1).

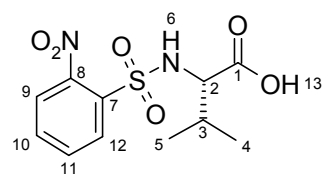
3.6 tert-Butyl-(2,3-dibrompropoxy)-dimethylsilan (**98**, TZD-158)



Dibrompropanol **97** (1 mL, 9.73 mmol) und Imidazol (1.86 g, 27.3 mmol) werden in DMF (10 mL) vorgelegt. Dazu wird unter Eiskühlung TBDMS-Cl (2.80 g, 18.6 mmol) gelöst in DMF (5 mL) langsam zugetropft. Nach 68 h Reaktionszeit wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit DCM (10 mL) versetzt. Die Lösung wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, die wässrige Phase mit Dichlormethan (10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird auf einer Kieselgelsäule aufgereinigt (CH/EE, 9:1 + 0.1 % TEA) und der Silylethers **98** (2.23 g, 6.7 mmol, 69 %) als farblose Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeCN): δ = 0.14 (s, 6H, 3-H), 0.95 (s, 9H, 2-H), 3.87 (ψs, 1H, 6-H), 3.89 (ψd, J = 1.2 Hz, 1H, 6-H), 3.95 (dd, J = 4.7 Hz, J = 11.5 Hz, 1H, 4-H), 4.06 (dd, J = 4.4 Hz, J = 11.5 Hz, 1H, 4-H), 4.33 (m, 1H, 5-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeCN): δ = -5.2 (3-C), 18.9 (1-C), 26.3 (2-C), 34.4 (6-C), 53.8 (5-C), 65.4 (4-C). **IR (KBr)**: 1255 (Si-C) cm⁻¹. **GC-MS(EI)**: 273, 275, 277 (M-C₄H₉)⁺. **R_f**: 0.64 (CH/EE, 9:1 + 0.1 % TEA).

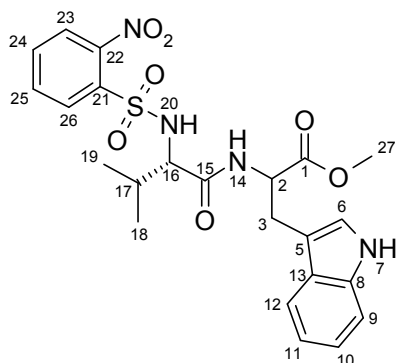
3.7 (S)-3-Methyl-2-(2-nitrophenylsulfonamido)butansäure (**99**, TZD-159)



Der Esters **96b** (1.01 g, 2.82 mmol) wird bei 0 °C in TFA/DCM (10 mL, 1:1) gelöst. Nach 2 h Reaktionszeit werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (EE + 0.1 % HOAc) gereinigt. Die Säure **99** (763 mg, 2.52 mmol, 90 %) wird als beiger Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.93 (d, J = 6.9 Hz, 3H, 4-H), 1.01 (d, J = 6.8 Hz, 3H, 5-H), 2.20 (m, 1H, 3-H), 4.05 (dd, J = 4.9 Hz, J = 9.5 Hz, 1H, 2-H), 6.03 (d, J = 9.5 Hz, 1H, 6-H), 7.73-7.77 (m, 2H, 10-H, 11-H), 7.90-7.93 (m, 1H, 12-H), 8.06-8.09 (m, 1H, 9-H), 9.07 (s, br, 1H, 13-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 17.2, 19.0 (4-C, 5-C), 31.2 (3-C), 61.6 (2-C), 125.6 (12-C), 130.3 (9-C), 133.0, 133.9 (10-C, 11-C), 134.0 (7-C), 147.5 (8-C), 176.2 (1-C). **IR (KBr)**: 3350 (NH), 1714 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 185 (20) [C₆H₄NO₄S]⁺, 257 (100) [M-CO₂]⁺, 320 (56) [M+NH₄]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 325.0467, berechnet für C₁₁H₁₄N₂NaO₆S⁺: 325.0465. **R_f**: 0.25 (EE).

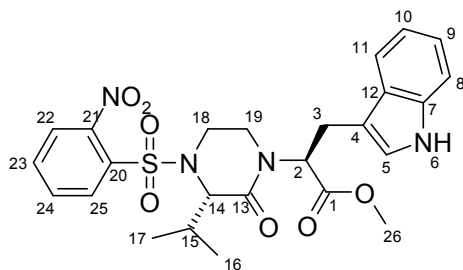
3.8 3-(1*H*-Indol-3-yl)-2-((*S*)-3-methyl-2-(2-nitrophenylsulfonamido)butanamido)propansäuremethylester (**100**, TZD-160)



Die Aminosäure **99** (701 mg, 2.32 mmol) wird in DCM (10 mL) gelöst und mit Tryptophanmethylester-Hydrochlorid (**156**) (654 mg, 2.57 mmol) und TBTU (883 mg, 2.75 mmol) versetzt. Unter Eiskühlung wird anschließend DIPEA (1.18 mL, 6.96 mmol) hinzugefügt und die Mischung für 44 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird danach sukzessive mit gesättigter Natriumchloridlösung (10 mL), wässriger Salzsäure (1 M, 10 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (10 mL) sowie Wasser (10 mL) gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE, 7:3). Das Dipeptid **100** (1.04 g, 2.07 mmol) wird in 89 % Ausbeute als gelber Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 18-H), 0.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 19-H), 1.12 (m, 1H, 17-H), 3.16 (ψd, *J* = 5.9 Hz, 2H, 3-H) 3.66 (s, 3H, 27-H), 3.83 (dd, *J* = 5.3 Hz, *J* = 8.2 Hz, 1H, 16-H), 4.68 (ddd, *J* = 6.0 Hz, *J* = 6.0 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, 2-H), 6.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 20-H), 6.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 14-H), 7.05 (d, *J* = 2.4, 1H, 6-H), 7.16 (ddd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, 11-H), 7.24 (ddd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 7.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, 10-H), 7.35-7.40 (m, 2H, 9-H, 24-H), 7.48-7.56 (m, 2H, 12-H, 25-H), 7.74 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, 26-H), 7.90 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, 23-H), 8.35 (s, 1H, 7-H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 17.1, 19.0 (18-C, 19-C), 27.6 (3-C), 31.3 (17-C), 52.4 (27-C), 52.8 (16-C), 63.0 (2-C), 109.5 (5-C), 111.4 (9-C), 118.4 (12-C), 119.7 (11-C), 122.3 (10-C), 123.0 (6-C), 125.4 (26-C), 127.2 (13-C), 130.2 (23-C), 132.7 (25-C), 133.6 (24-C), 133.6 (21-C), 136.2 (8-C), 147.5 (22-C), 169.7 (15-C), 171.8 (1-C). IR (KBr): 1740 (CO), 1664 (CO) cm⁻¹. HPLC-ESI-MS: *m/z* (%) = 503 (100) [M+H]⁺, 520 (11) [M+NH₄]⁺. HR-ESI-MS: *m/z* = 525.1422, berechnet für C₂₃H₂₆N₄NaO₇S⁺: 525.1414. R_f: 0.38 (CH/EE, 1:1).

3.9 (*S*)-3-(1*H*-Indol-3-yl)-2-((*S*)-3-isopropyl-4-(2-nitrophenylsulfonyl)2-2-oxopiperazin-1-yl)propansäuremethylester (**101**, TZD-167)

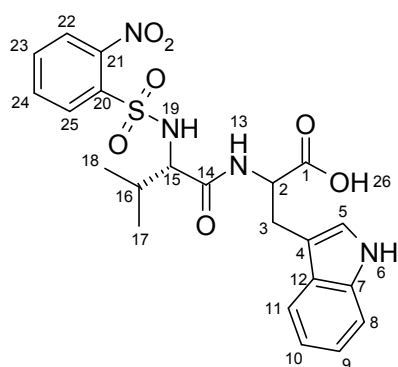


Das Dipeptid **100** (22.1 mg, 44.0 μmol) wird in DMF (2 mL) gelöst und mit Kaliumcarbonat (27.7 mg, 197 μmol) versetzt. Nach Zugabe von 1,2-Dibromethan (35 μl, 406 μmol) wird der Ansatz 48 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wird Wasser (3 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Essigester (3 mL) extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 6:4) wird das 2-Ketopiperazin **101** (15.4 mg, 29 μmol, 66%) als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.74 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, 16-H), 0.76 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, 17-H), 1.87 (m, 1H, 15-H), 3.19 (m, 2H, 19-H), 3.24 (dd, *J* = 15.5 Hz, *J* = 11.2 Hz, 1H, 3-H), 3.35 (m, 1H, 18-H), 3.48 (dd, *J* = 15.4 Hz, *J* = 5.0 Hz, 1H, 3-H), 3.68 (s, 3H, 26-H), 3.80 (dd, *J* = 14.1 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, 18-H), 4.12 (dd, *J* = 7.7 Hz,

$J = 0.9$ Hz, 1H, 14-H), 5.18 (dd, $J = 11.1$ Hz, $J = 5.02$ Hz, 1H, 2-H), 7.05 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, 5-H), 7.13 (q, $J = 7.07$ Hz, 1H, 9-H), 7.21 (q, $J = 7.6$ Hz, 1H, 10-H), 7.36 (d, $J = 8.08$ Hz, 1H, 11-H), 7.55 (d, $J = 7.84$ Hz, 1H, 8-H), 7.64 (dd, $J = 6.9$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H, 25-H), 7.07 (m, 2H, 23-H, 24-H), 7.99 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, 22-H), 8.14 (s, 1H, 6-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 19.4$, 19.6 (16-C, 17-C), 24.1 (3-C), 31.4 (15-C), 40.6 (18-C), 43.4 (19-C), 52.2 (27-C), 57.5 (2-C), 64.5 (14-C), 110.6 (4-C), 111.3 (8-C), 118.1 (11-C), 119.7 (10-C), 122.3 (9-C), 122.7 (5-C), 124.7 (25-C), 127.0 (12-C), 130.9 (22-C), 132.0 (24-C), 133.1 (23-C), 133.8 (7-C), 136.2 (20-C), 148.1 (21-C), 167.1 (13-C), 170.5 (1-C). **IR (KBr)**: 1741 (CO), 1647 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 529 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: $m/z = 551.1575$, berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{S}^+$: 551.1571. **R_f**: 0.29 (CH/EE, 1:1).

3.10 3-(1*H*-Indol-3-yl)-2-((*S*)-3-methyl-2-(2-nitrophenylsulfonamido)butanamido)propanoic acid (103, TZD-170)



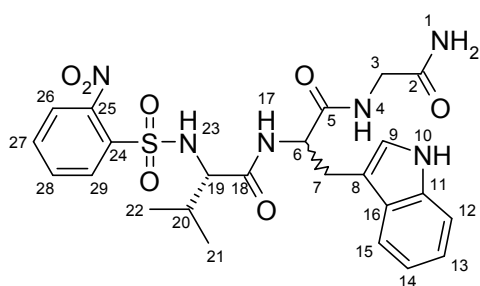
Der Carbonsäureester **100** (502 mg, 1.00 mmol) wird in THF (10 mL) gelöst und mit Lithiumhydroxid (194 mg, 8.22 mmol) in Wasser (10 mL) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 3 h wird Wasser (10 mL) hinzugegeben und die Lösung mit Salzsäure (1M) auf pH 4 angesäuert. Die Lösung wird fünfmal mit EE (10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Die Carbonsäure **103** (482 mg, 0.99 mmol, 99 %) wird als gelber Schaum erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeCN): $\delta = 0.87$ (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 17-H), 0.96 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 18-H), 2.02 (m, 1H, 16-H), 2.99 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 14.8$ Hz, 1H, 3-H), 3.10 (dd, $J = 5.4$ Hz, $J = 14.9$ Hz, 1H, 3-H), 3.84 (dd, $J = 5.7$ Hz, $J = 9.2$ Hz, 1H, 15-H), 4.31 (ddd, $J = 7.5$ Hz, $J = 5.4$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 2-H), 6.33 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, 19-H), 6.88 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 13-H), 7.07 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, 5-H), 7.12 (ddd, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.1$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H, 10-H), 7.21 ($J = 8.1$ Hz, $J = 7.1$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H, 9-H), 7.36 (ddd, $J = 8.1$ Hz, $J = 7.1$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H, 23-H), 7.47 (ddd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.0$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.50 (d, $J = 7.92$ Hz, 1H, 11-H), 7.53 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1H, 24-H), 7.74 (dd, $J = 1.1$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1H, 25-H), 7.82 (dd, $J = 7.92$, $J = 1.3$, 1H, 22-H), 9.20 (s, 1H, 6-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeCN): $\delta = 16.7$, 18.4 (17-C, 18-C), 27.0 (3-C), 31.6 (16-C), 52.9 (15-C), 62.0 (2-C), 109.4 (4-C), 111.5 (8-C), 118.3 (11-C), 119.1 (10-C), 121.7 (9-C), 123.7 (5-C), 124.9 (25-C), 127.3 (12-C), 130.0 (22-C), 132.7 (24-C), 132.9 (23-C), 134.0 (20-C), 136.5 (7-C), 147.5 (21-C), 169.9 (14-C), 172.0 (1-C). **IR (KBr)**: 1726 (CO), 1655 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 489.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: $m/z = 567.1649$, berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{NaO}_7\text{S}^+$: 567.1632. **R_f**: 0.12 (CH/EE, 1:1 + 0.1 % HOAc).

3.11 (2*S*)-*N*-(1-(2-Amino-2-oxoethylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)-3-methyl-2-(2-nitrophenylsulfonamido)butanamide (104, TZD-171)

Die Säure **103** (464 mg, 951 μmol) wird in DCM (20 mL) gelöst. Dazu wird Glycinamid-Hydrochlorid (138 mg, 1.25 mmol), TBTU (475 mg, 1.04 mmol) und DIPEA (500 μl , 2.94 mmol) hinzugegeben und der Ansatz für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird Wasser (40 mL) hinzugefügt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit DCM (20 mL) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen, Ent-

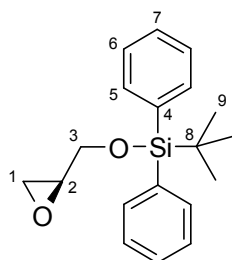
fernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (EE/EtOH, 9:1) wird das Tripeptid **104** (450 mg, 826 μmol , 87 %) als Diastereomerenmisch (6:4) erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeCN): δ = 0.63 (d, J = 6.8 Hz, 1.5H, 21-H), 0.77 (d, J = 6.8 Hz, 1.5H, 22-H), 0.85 (d, J = 6.8 Hz, 1.5H, 21-H), 0.90 (d, J = 6.8 Hz, 1.5H, 22-H), 1.84 (m, 0.5H, 20-H), 2.01 (m, 0.5H, 20-H), 2.90 (dd, J = 14.8 Hz, J = 7.6 Hz, 0.5H, 7-H), 3.02 (dd, J = 14.7 Hz, J = 8.3 Hz, 0.5H, 7-H), 3.05 (dd, J = 14.8 Hz, J = 6.5 Hz, 0.5H, 7-H), 3.17 (dd, J = 14.5 Hz, J = 6.0 Hz, 0.5H, 7-H), 3.56 (dd, J = 17.0 Hz, J = 5.5 Hz, 0.5 H, 3-H), 3.64 (dd, J = 17.0 Hz, J = 5.5 Hz, 0.5-H, 3-H), 3.68-

3.74 (m, 1H, 3-H), 3.82 (d, J = 5.7 Hz, 1H, 19-H), 4.21 (dd, J = 14.0 Hz, J = 6.7 Hz, 0.5H, 6-H), 4.43-4.48 (m, 0.5H, 6-H), 5.90 (s, br, 1H, 1-H), 6.33 (m, 1H, 1-H), 6.43 (m, 1H, 23-H), 6.88 (t, J = 5.6 Hz, 0.5 H, 4-H), 6.91 (t, J = 5.6 Hz, 0.5H, 4-H), 7.04-7.20 (m, 4H, 9-H, 13-H, 14-H, 17-H), 7.38-7.83 (m, 5H, 12-H, 15-H, 27-H, 28-H, 29-H), 7.88 (dd, J = 7.9 Hz, J = 1.2 Hz, 0.5H, 26-H), 7.99 (dd, J = 7.1 Hz, J = 2.1 Hz, 0.5 H, 26-H), 9.22 (s, 0.5H, 10-H), 9.26 (s, 0.5H, 10-H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, MeCN): δ = 16.3, 16.8, 18.4 (21-C, 22-C), 27.3, 27.6 (7-C) 31.4, 31.5 (20-C), 42.1 (3-C), 53.9, 54.4 (6-C), 62.2, 62.3 (19-C), 109.6, 109.7 (8-C), 111.4, 111.5 (12-C), 118.4, 118.5 (15-C), 118.9, 119.0 (14-C), 121.6, 121.7 (13-C), 123.8, 123.9 (9-C), 125.0, 125.0 (29-C), 127.2 (16-C), 130.2, 130.2 (26-C), 132.7 132.8 (28-C), 132.9, 133.0 (27-C), 134.1, 134.1 (24-C), 136.4, 136.5 (11-C), 147.6 (25-C), 170.3, 170.4, 171.1, 171.2, 171.3, 171.4 (2-C, 5-C, 18-C). **IR (KBr)**: 1665 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 545 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 511.1257, berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{S}^+$: 511.1258. **R_f**: 0.30 (EE/EtOH, 9:1).

3.12 (S)-Glycidyl-tert-butyldiphenylsilylether (109, TZD-177)

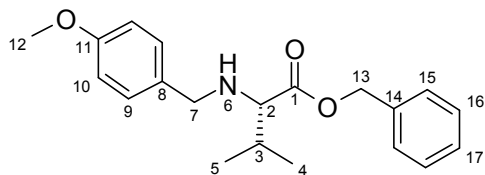


R-Glycidol (**107**) (7.59 mL, 114 mmol) und *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (35.9 mL, 138 mmol) werden in Dichlormethan (300 mL) gelöst und mit Triethylamin (19.7 mL, 142 mmol) und DMAP (666 mg, 5.5 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 16 h wird Wasser (50 mL) hinzugegeben. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase mit Essigester (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 25:1) wird der Silylether

109 (31.0 g, 99 mmol, 87 %) als farblose Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.09 (s, 9H, 9-H), 2.63 (dd, J = 5.2 Hz, J = 2.8 Hz, 1H, 1-H), 2.77 (dd, J = 5.1 Hz, J = 4.2 Hz, 1H, 1-H), 3.15 (m, 1H, 2-H), 3.74 (dd, J = 11.8 Hz, J = 4.7 Hz, 1H, 3-H), 3.88 (dd, J = 11.8 Hz, J = 3.2 Hz, 1H, 3-H), 7.38 -7.47 (m, 6H, 6-H, 7-H), 7.69 - 7.73 (m, 4H, 5-H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3): δ = 19.2, 26.7 (9-C), 44.5 (1-C), 52.3 (2-C), 64.3 (3-C), 127.7 (6-C), 129.7 (7-C), 133.3 (4-C), 135.5, 135.6 (5-C). **IR (KBr)**: 2998, 2958, 2857, 1472, 1427, 1112 cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 235 (75) $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_5]^+$, 335 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 335.1436, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}_2\text{Si}^+$: 335.1438. **R_f**: 0.50 (CH/EE, 8:2).

3.13 (S)-2-(4-Methoxybenzylamino)-3-methylbutansäurebenzylester (**111**, TZD-176)

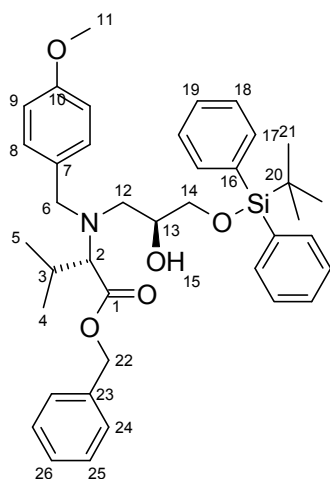


Valinbenzylester-*p*-tosylat (5.99 g, 15.8 mmol) und Natriumcyanoborhydrid (1.51 g, 23.7 mmol) werden in Methanol (15 mL) suspendiert, langsam Anisaldehyd (2.2 mL, 19.3 mmol) hinzugegeben und der Ansatz für 15 h gerührt. Nach Zugabe von Wasser (25 mL) wird mit Essigester (4x 25 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden

mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (25 mL) und gesättigter Natriumchloridlösung (25 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH:EE, 12:1) des Rohprodukts wird in 95 % Ausbeute das Amin **111** (4.94 g, 15.1 mmol) als farblose Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, 3H, *J* = 4.6 Hz, 4-H), 0.95 (d, 3H *J* = 4.7 Hz, 5-H), 1.75 (s, br, 1H, 6-H), 1.96 (m, 1H, 3-H), 3.06 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, 2-H), 3.54 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, 7-H), 3.77 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, 7-H), 3.81 (s, 3H, 12-H), 5.18 (s, 2H, 13-H), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 9-H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 10-H), 7.36-7.41 (m, 5H, 15-H, 16-H, 17-H). ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 18.6, 19.3 (4-C, 5-C), 31.7 (3-C), 51.9 (7-C), 55.2 (12-C), 66.2 (13-C), 66.4 (2-C), 113.6 (10-C), 128.2, 128.4, 128.6 (15-C, 16-C, 17-C), 129.4 (9-C), 132.2 (8-C), 136.0 (14-C) 158.7 (11-C), 175.2 (1-C). IR (KBr): 3435 (NH), 1730 (CO) cm⁻¹. HPLC-ESI-MS: *m/z* (%) = 121 (100) [C₈H₉O]⁺, 328 (24) [M+H]⁺, 350 (3) [M+Na]⁺. HR-ESI-MS: *m/z* = 350.1722, berechnet für C₂₀H₂₅NNaO₃⁺: 350.1727. R_f: 0.16 (CH/EE, 9:1).

3.14 (S)-2-(((S)-3-*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-hydroxypropyl)(4-methoxybenzyl)amino)-3-methylbutansäurebenzylester (**112**, TZD-178)

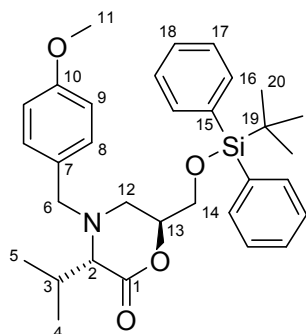


Die Aminosäure **111** (4.30 g, 13.0 mmol) und das Epoxids **109** (3.68 g, 11.8 mmol) werden in trockenem Acetonitril (20 mL) vorgelegt. Dazu wird Magnesiumtriflat (4.30 g, 13.3 mmol) gegeben und das Gemisch für 24 h auf 75 °C erwärmt. Anschließend wird Wasser (25 mL) hinzugegeben und das Gemisch wird dreimal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Reinigung auf einer Kieselgelsäule wird das Produktgemisch (**112/113**, 88:12) (6.52 g, 10.2 mmol, 85 %) als farblose Flüssigkeit erhalten. 15 % des Epoxids **109** (556 mg, 1.78 mmol) werden reisoliert.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 4-H), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 5-H), 1.06 (s, 9H, 21-H), 2.16 (m, 1H, 3-H), 2.57 (dd, *J* = 13.4 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, 12-H), 2.89 (dd, *J* = 13.4 Hz, *J* = 9.9 Hz, 1H, 12-H), 2.96 (s, br, 1H, 15-H), 3.01 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, 2-H), 3.31 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, 6-H), 3.64 (dd, *J* = 10.6 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, 14-H), 3.67 (dd, *J* = 10.6 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H, 14-H), 3.81 (s, 3H, 11-H), 3.82 (m, 1H, 13-H), 3.93 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, 6-H), 5.19 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, 22-H), 5.26 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, 22-H), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 9-H), 7.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 8-H), 7.34-7.47 (m, 11H, 18-H, 19-H, 24-H, 25-H, 26-H), 7.67-7.70 (m, 4H, 17-H). ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 19.2 (20-C), 19.5 (4-C), 19.9 (5-C), 26.8 (21-C), 27.2 (3-C), 52.9

(12-C), 54.6 (6-C), 55.2 (11-C), 65.8 (22-C), 66.0 (14-C), 68.0 (13-C), 69.2 (2-C), 113.8 (9-C), 127.6, 127.6, 127.7, 128.5, 129.6 (18-C, 19-C, 24-C, 25-C, 26-C), 130.2 (8-C), 130.7, 133.4, 133.5 (7-C, 16-C), 135.6, 135.6 (17-C), 135.9 (23-C), 158.7 (10-C), 171.7 (1-C). **IR (KBr):** 3442 (OH) 1730 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 640 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 640.3453, berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{NO}_5\text{Si}^+$: 640.3453. **R_f:** 0.35 (CH/EE, 9:1).

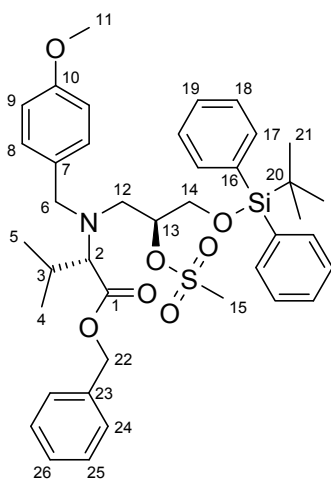
3.15 (3*S*,6*S*)-6-((*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)methyl)-3-isopropyl-4-(4-methoxy-benzyl)morpholin-2-on (113, TZD-253)³



¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.02 (s, 9H, 20-H), 1.12 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 4-H), 1.21 (d, J = 6.9 Hz, 3H, 5-H), 2.21 (m, 1H, 3-H), 2.29 (dd, J = 10.2 Hz, J = 12.2 Hz, 1H, 12-H), 3.03 (dd, J = 2.3 Hz, J = 12.3 Hz, 1H, 12-H), 3.25 (d, J = 3.6 Hz, 1H, 2-H), 3.33 (d, J = 13.2 Hz, 1H, 6-H), 3.68 (dd, J = 6.2 Hz, J = 10.9 Hz, 1H, 14-H), 3.79 (dd, J = 4.4 Hz, J = 10.9 Hz, 1H, 14-H), 3.85 (s, 3H, 11-H), 3.93 (d, J = 13.3 Hz, 1H, 6-H), 4.44 (m, 1H, 13-H), 6.92 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 9-H), 7.26 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 8-H), 7.38-7.47 (m, 6H, 17-H, 18-H), 7.62 (m, 4H, 16-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl_3): δ = 18.0 (4-C), 19.1 (19-C), 19.9 (5-C), 26.7 (20-C), 32.2 (3-C), 49.8 (12-C), 55.3 (11-C),

59.8 (6-C), 63.9 (14-C), 70.2 (2-C), 78.0 (13-C), 113.9 (9-C), 127.7 (17-C), 129.8 (18-C), 129.8 (8-C), 132.7, 133.0 (7-C, 15-C), 135.5, 135.6 (16-C), (7-C, 15-C), 159.0 (10-C), 170.0 (1-C). **IR (KBr):** 1736 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 532 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 532.2877, berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{NO}_4\text{Si}^+$: 532.2878. **R_f:** 0.35 (CH/EE, 9:1).

3.16 (S)-2-(((S)-3-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-(methylsulfonyloxy)propyl)(4-methoxybenzyl)amino)-3-methylbutansäurebenzylester (115, TZD-186)



Der Alkohol **112** (56.7 mg, 88.6 μmol) wird in Dichlormethan (2 mL) vorgelegt und mit Mesylchlorid (12 μl , 155 μmol) und Triethylamin (25 μl , 180 μmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 2 h wird Wasser (10 mL) zugegeben und das Gemisch mit Dichlormethan (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie (CH/EE, 12:1) wird das Mesylat **115** (47.6 mg, 66 μmol , 75 %) als farbloses Öl erhalten.

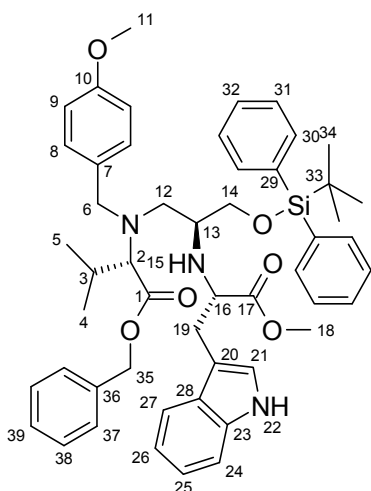
¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 0.81 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 4-H), 0.96 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 5-H), 1.07 (s, 9H, 21-H), 2.01 (m, 1H, 2-H), 2.78 (dd, J = 14.7 Hz, J = 5.2 Hz, 1H, 12-H), 2.87 (s, 3H, 15-H), 2.97 (d, J = 10.7 Hz, 1H, 2-H), 3.11 (dd, J = 14.7 Hz, J = 7.1 Hz, 1H, 12-H), 3.29 (d, J = 13.4 Hz, 1H, 6-H), 3.76-3.85 (m, 2H, 14-H), 3.80 (s, 3H, 11-H), 3.91 (d, J = 13.4 Hz, 1H, 6-H), 4.58 (m, 1H, 13-H), 5.16 (d, J = 12.0 Hz, 1H, 22-H), 5.21 (d, J = 12.1 Hz, 1H, 22-H), 6.80 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 9-H), 7.16 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 8-H), 7.33-7.48 (m, 11-H, 18-H, 19-H, 24-H, 25-H, 26-H), 7.64-7.68 (m, 4H, 17-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl_3): δ = 19.1 (20-C), 19.5 (5-C), 19.8 (4-C), 26.7 (21-C), 27.7 (3-C), 38.4 (15-C), 52.2 (12-C), 55.2 (11-C), 55.5 (6-C), 64.2 (13-C), 65.8 (14-C), 70.2

³ **113** wurde nach Umsetzung zu **118** chromatographisch abgetrennt.

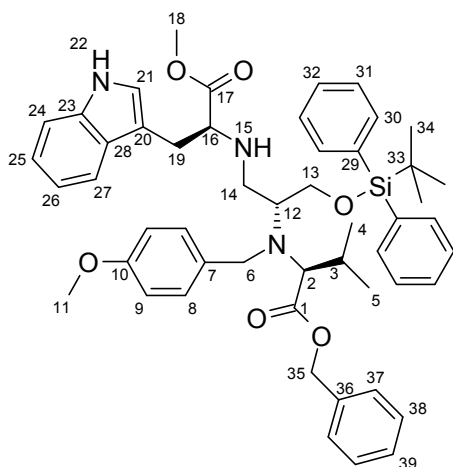
(2-C), 81.6 (13-C), 113.6 (9-C), 127.8, 128.3, 128.5, 128.6, 129.9, 129.9 (18-H, 19-H, 24-H, 25-H, 26-H), 130.4 (8-C), 130.6, 132.6, 132.9 (7-C, 16-C), 135.5, 135.6 (17-C), 135.9 (23-C), 158.8 (10-C), 171.2 (1-C). **IR (KBr):** 1730(CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 718 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 718.3226, berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{NO}_7\text{SSi}^+$: 718.3228. **R_f:** 0.30 (CH/EE, 9:1).

3.17 (S)-2-(((S)-2-((S)-3-(1H-Indol-3-yl)-1-methoxy-1-oxopropan-2-ylamino)-3-(tert-butyldiphenylsilyloxy)propyl)(4-methoxybenzyl)amino)-3-methylbutan-säurebenzylester (**118**, TZD-187)

Das Gemisch **112/113** (6.34 g, **112** 8.72 mmol, **113** 1.19 mmol) und TEA (2.3 mL, 16.6 mmol) werden in DCM (60 mL) gelöst und bei 0 °C mit Mesylchlorid (1.2 mL, 15.5 mmol) versetzt. Nach Rühren für 80 min wird erneut TEA (800 μl , 5.77 mmol) und Mesylchlorid (400 μl , 5.17 mmol) hinzugegeben und weitere 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (50 mL) zum Reaktionsemisch hinzugefügt und mit DCM (4x 100 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Gemisch wird mit Dichlormethan über Kieselgel filtriert und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet. Der ölige Rückstand wird in Acetonitril (40 ml) gelöst und mit Tryptophanmethylester **156** (3.33 g, 15.1 mmol) als freies Amin versetzt. Nach Rühren bei 60 °C für 18 h wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (50 mL) hinzugefügt und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und säulenchromatographisch (CH/EE, 9:1) gereinigt. Das Amin **118** (1.89 g, 2.26 mmol, 26 %) und das Amin **119** (2.95 g, 3.52 mmol, 40 %) werden als farbloser Schaum erhalten.

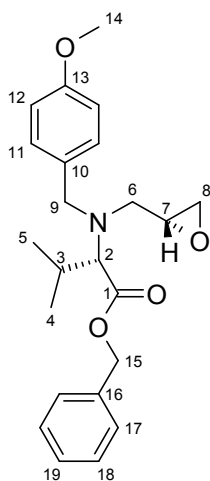


¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 0.79 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 4-H), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 5-H), 1.05 (s, 9H, 34-H), 2.08 (m, 1H, 3-H), 2.42 (dd, J = 13.0 Hz, J = 3.7 Hz, 12-H), 2.69 (dd, J = 12.8 Hz, J = 10.6 Hz, 1H, 12-H), 2.94 (d, J = 10.7 Hz, 1H, 2-H), 2.99 (m, 1H, 13-H), 3.10-3.15 (m, 2H, 19-H, 6-H), 3.18 (dd, J = 14.5 Hz, J = 5.6 Hz, 1H, 19-H), 3.50 (m, 4H, 18-H, 14-H), 3.61 (dd, J = 10.4 Hz, J = 5.0 Hz, 1H, 14-H), 3.80 (s, 3H, 11-H), 3.95 (d, J = 12.8 Hz, 1H, 6-H), 3.97 (q, J = 6.3 Hz, 1H, 16-H), 5.14 (d, J = 12.2 Hz, 1H, 35-H), 5.20 (d, J = 12.2 Hz, 1H, 35-H), 6.74 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 9-H), 7.05 (d, J = 2.2 Hz, 1H, 21-H), 7.07-7.12 (m, 3H, 25-H, 8-H), 7.20 (q, J = 7.6 Hz, 1H, 26-H), 7.30-7.40 (m, 10H, 24-H, 31-H, 32-H, 38-H, 39-H), 7.41-7.46 (m, 2H, 37-H), 7.55 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 27-H), 7.61-7.66 (m, 4H, 30-H), 7.90 (s, 1H, 22-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl_3): δ = 19.2 (33-C), 19.4 (4-C), 19.9 (5-C), 26.8 (34-C), 27.1 (3-C), 29.3 (19-C), 51.2 (18-C), 52.3 (12-C), 54.0 (13-C), 54.1 (6-C), 55.2 (11-C), 59.1 (16-C), 65.5 (35-C), 66.6 (14-C), 68.2 (2-C), 110.9 (24-C), 111.4 (20-C), 113.4 (9-C), 119.0 (27-C), 119.3 (25-C), 121.3 (26-C), 123.1 (21-C), 127.7 (28-C), 127.6, 127.6, 128.2, 128.5, 128.5 (31-C, 32-C, 38-C, 39-C), 129.5, 129.6 (37-C), 130.4 (8-C), 130.9 (7-C), 133.5, 133.6 (29-C), 135.6, 135.7 (30-C), 136.0 (36-C), 136.1 (23-C), 158.5 (10-C), 171.8 (1-C), 175.6 (17-C). **IR (KBr):** 1731 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 840 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 840.4409, berechnet für $\text{C}_{51}\text{H}_{62}\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}^+$: 840.4402. **R_f:** 0.27 (CH/EE, 8:2).

3.18 (S)-2-(((4S,7R)-4-((1H-Indol-3-yl)methyl)-11,11-dimethyl-3-oxo-10,10-diphenyl-2,9-dioxa-5-aza-10-siladodecan-7-yl)(4-methoxybenzyl)amino)-3-methyl-butansäurebenzylester (119, TZD-252)


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.75 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 4-H), 0.86 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 5-H), 1.05 (s, 9H, 34-H), 1.77 (s, br, 15-H), 1.93 (m, 1H, 3-H), 2.55 (dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, 14-H), 2.88 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 7.5 Hz, 1H, 14-H), 3.00-3.06 (m, 3H, 2-H, 12-H, 19-H), 3.10 (dd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, 19-H), 3.54 (ψt, *J* = 6.6 Hz, 1H, 16-H), 3.62 (s, 3H, 18-H), 3.68-3.72 (m, 3H, 13-H, 6-H), 3.79 (m, 3H, 11-H), 4.10 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H, 6-H), 4.99 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, 35-H), 5.11 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, 35-H), 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 3H, 9-H), 6.94 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 21-H), 7.08-7.12 (m, 3H, 8-H, 26-H), 7.19 (ψt, *J* = 8.0 Hz, 1H, 25-H), 7.30 (m, 10H, 24-H, 31-H, 32-H, 38-H, 39-H), 7.41-7.47 (m, 2H, 37-H), 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 27-H), 7.64-7.67 (m, 4H, 30-

H), 7.83 (s, 1H, 22-H). ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 19.1 (33-C), 19.6 (4-C), 20.0 (5-C), 26.9 (34-C), 28.1 (3-C), 29.2 (19-C), 46.0 (14-C), 50.7 (6-C), 51.5 (18-C), 55.2 (11-C), 59.0 (12-C), 62.0 (16-C), 65.5 (13-C), 65.9 (35-C), 67.9 (2-C), 111.0 (24-C), 111.5 (20-C), 113.4 (9-C), 118.8 (27-C), 119.4 (26-C), 121.9 (25-C), 122.8 (21-C), 127.5 (28-C), 127.6, 128.1, 128.4, 128.5 (31-C, 32-C, 38-C, 39-C), 129.6 (37-C), 129.8 (8-C), 132.4 (7-C), 133.5, 133.6 (29-C), 135.7, 135.7 (30-C), 135.9 (36-C), 136.1 (23-C), 158.4 (10-C), 173.6 (1-C), 175.3 (17-C). IR (KBr): 1730 (CO) cm⁻¹. HPLC-ESI-MS: *m/z* (%) = 840 (100) [M+H]⁺. HR-ESI-MS: *m/z* = 840.4410, berechnet für C₅₁H₆₂N₃O₆Si⁺: 840.4402. R_f: 0.22 (CH/EE, 8:2).

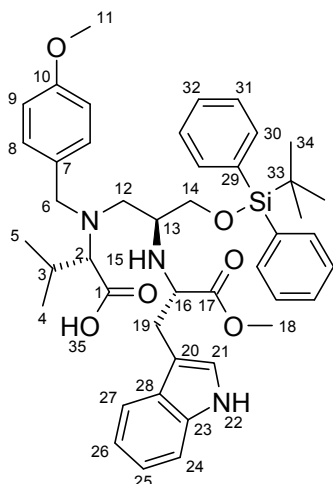
3.19 (S)-2-((4-methoxybenzyl)((R)-oxiran-2-ylmethyl)amino)-3-methylbutan-säurebenzylester (123, TZD-189)


Das Mesylat **112** (98.3 mg, 137 μmol) wird in THF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit einer 1 M Lösung von TBAF (280 μl) in THF versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 18 h wird Wasser (10 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit Essigester (3x, 10 mL) extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 9:1) wird das Epoxid **123** (25.2 mg, 66 μmol, 48 %) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 4-H), 1.02 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 5H), 2.09 (m, 1H, 3-H), 2.33 (dd, *J* = 14.4 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, 6-H), 2.4 (dd, *J* = 5.0 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1H, 8-H), 2.67 (ψt, *J* = 4.5 Hz, 1H, 8-H), 3.00-3.05 (m, 2H, 2-H, 7-H), 3.14 (dd, *J* = 2.5 Hz, *J* = 14.4 Hz, 1H, 6-H), 3.37 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, 9-H), 3.81 (s, 3H, 14-H), 4.07 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, 9-H), 5.15 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, 15-H), 5.25 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, 15-H), 6.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 12-H), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 11-H),

7.35-7.45 (m, 5H, 17-H, 18-H, 19-H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 19.4, 19.7 (4-C, 5-C), 27.6 (3-C), 44.1 (8-C), 52.2 (7-C), 52.9 (6-C), 55.2 (14-C), 55.5 (9-C), 65.7 (15-C), 69.3 (2-C), 113.5 (12-C), 128.2, 128.5 (17-C, 18-C, 19-C), 129.7 (11-C), 131.2 (10-C), 136.1 (16-C), 158.6 (13-C), 172.0 (1-C). IR (KBr): 1729 (CO) cm⁻¹. HPLC-ESI-MS: *m/z* (%) = 121 (100) [C₈H₉O]⁺, 384 (20) [M+H]⁺, 406 (18) [M+Na]⁺. HR-ESI-MS: *m/z* = 406.1983, berechnet für C₂₃H₂₉NNaO₄⁺: 406.1989. R_f: 0.38 (CH/EE, 8:2).

3.20 (S)-2-(((R)-2-((S)-3-(1H-Indol-3-yl)-1-methoxy-1-oxopropan-2-ylamino)-3-(tert-butyldiphenylsilyloxy)propyl)(4-methoxybenzyl)amino)-3-methylbutansäure (**126**, TZD-196)

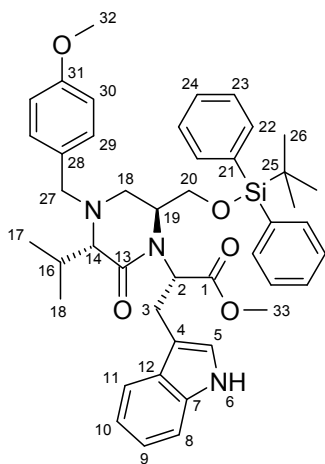


Der Ester **118** (1.84 g, 2.20 mmol) wird in Ethanol (150 mL) gelöst und mit Pd(OH)₂/C (337 mg) versetzt. Anschließend wird jeweils 10 min Argon, gefolgt von Wasserstoff durch das Reaktionsgemisch geleitet. Danach wird der Ansatz über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Säure **126** (1.57 g, 55 mmol, 95 %) wird als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, MeCN + 1 Tr. D₂O): δ = 0.84 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 4-H), 0.87 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 5-H), 1.00 (s, 9H, 34-H), 2.00 (m, 1H, 3-H), 2.48 (dd, *J* = 12.9 Hz, *J* = 3.7 Hz, 1H, 18-H), 2.60 (dd, *J* = 12.8 Hz, *J* = 10.8 Hz, 1H, 18-H), 2.86 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, 2-H), 2.94 (m, 1H, 13 H), 3.08 (dd, *J* = 14.4 Hz, *J* = 6.4 Hz, 1H, 19-H), 3.14 (dd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 5.6 Hz, 1H, 19-H), 3.21 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, 6-H), 3.44 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, 14-H), 3.54 (s, 3H, 18-H), 3.57 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 4.7 Hz, 1H, 14-H), 3.78 (s, 3H, 11-H), 3.90 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H, 16-H), 3.94 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, 6H), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 9-H), 7.02 (q, *J* = 7.5 Hz, 1H, 25-H), 7.07 (s, 1H, 21-H), 7.11-7.15 (m, 3H, 8-H, 26-H), 7.39-7.48 (m, 8H, 24-H, 27-H, 31-H, 32-H), 7.62 (d, *J* = 7.0 Hz, 4H, 30-H). ¹³C-NMR (150 MHz, MeCN + 1 Tr. D₂O): δ = 20.3 (33-C), 20.4 (4-C), 21.0 (5-C), 27.8 (34-C), 28.2 (3-C), 28.4 (19-C), 52.6 (18-C), 53.8 (12-C), 55.1 (6-C), 55.2 (13-C), 56.5 (11-C), 60.3 (16-C), 67.6 (14-C), 70.0 (2-C), 111.3 (20-C), 112.7 (24-C), 114.9 (9-C), 120.0 (27-C), 120.3 (25-C), 122.8 (26-C), 125.2 (21-C), 129.1 (28-C), 129.3 (31-C), 131.3 (32-C), 132.0 (8-C), 134.8 (7-C), 134.9 (29-C), 136.9 (30-C), 137.0 (30-C), 137.8 (23-C), 160.2 (10-C), 173.6 (17-C), 176.7 (1-C). IR (KBr): 1739 (CO), 1707 (CO) cm⁻¹. HPLC-ESI-MS: *m/z* (%) = 750 (100) [M+H]⁺. HR-ESI-MS: *m/z* = 750.3929, berechnet für C₄₄H₅₆N₃O₆Si⁺: 750.3933. R_f: 0.76 (EE/EtOH, 1:1).

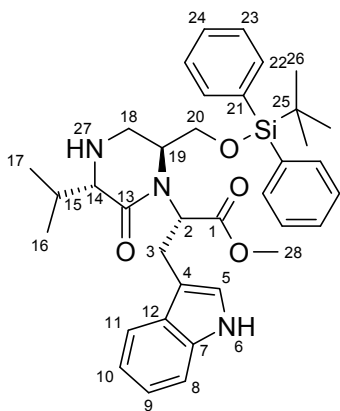
3.21 (S)-2-((3S,6R)-6-((tert-Butyldiphenylsilyloxy)methyl)-3-isopropyl-4-(4-methoxybenzyl)-2-oxopiperazin-1-yl)-3-(1H-indol-3-yl)propansäuremethylester (**125**, TZD-194)

Der Ester **118** (1.88 g, 2.23 mmol) wird in Ethanol (150 mL) gelöst und mit Pd(OH)₂/C (357 mg) versetzt. Anschließend wird jeweils 10 min Argon, gefolgt von Wasserstoff durch das Reaktionsgemisch geleitet. Danach wird der Ansatz für 9 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknen des Rohprodukts im Hochvakuum wird dieses in Acetonitril (100 mL) gelöst und HATU (1.39 g, 3.66 mmol) zugegeben. Bei 0 °C wird DIPEA (960 µl, 5.67 mmol) hinzugefügt und der Ansatz für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird Wasser (100 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit DCM (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung (100 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 8:2) wird das 2-Ketopiperazin **125** (973 mg, 1.33 mmol, 59 %) als farbloser Schaum und das *N*-entschützte 2-Ketopiperazin **128** (437 mg, 0.72 mmol, 32 %) ebenfalls als farbloser Schaum erhalten.



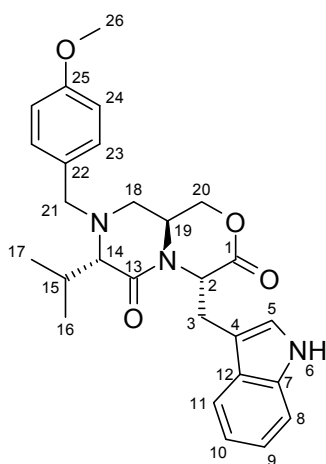
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (s, 9H, 26-H), 1.04 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16-H), 1.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 17-H), 2.31 (m, 1H, 15-H), 2.53 (dd, *J* = 13.1 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H, 18-H), 2.81 (m, 2H, 20-H), 2.94 (dd, *J* = 13.1 Hz, *J* = 4.1 Hz, 1H, 18-H), 3.12 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, 14-H), 3.19 (m, 1H, 19-H), 3.45 (dd, *J* = 15.1 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, 3-H), 3.49 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, 27-H), 3.57 (dd, *J* = 15.1 Hz, *J* = 10.3 Hz, 1H, 3-H), 3.61 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, 27-H), 3.72 (s, 3H, 33-H), 3.79 (s, 3H, 32-H), 3.80 (m, 1H, 2-H), 6.66 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 5-H), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 30-H), 7.03 (ψt, *J* = 7.4 Hz, 1H, 9-H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 29-H), 7.15 (ψt, *J* = 7.5 Hz, 1H, 10-H), 7.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 11-H), 7.34 (ψt, *J* = 7.4 Hz, 2H, 21-H), 7.36-7.41 (m, 6H, 23-H, 24-H), 7.43-7.49 (m, 3H, 21-H, 8-H), 7.55 (s, 1H, 6-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 18.8 (25-C), 20.1 (16-C), 21.0 (17-C), 24.1 (3-C), 26.6 (26-C), 29.9 (15-C), 46.3 (18-C), 51.9 (33-C), 55.2 (32-C), 58.2 (27-C), 59.5 (19-C), 62.2 (2-C), 62.7 (20-C), 68.4 (14-C), 111.0 (8-C), 112.9 (4-C), 113.6 (30-C), 118.9 (11-C), 119.5 (9-C), 122.0 (10-C), 122.5 (5-C), 127.7 (23-C, 24-C), 127.8 (12-C), 129.7, 129.8 (22-C), 129.8 (29-C), 130.8 (28-C), 133.1 (21-C), 133.2 (21-C), 135.5 (22-C), 135.8 (7-C), 158.7 (31-C), 171.4, 171.7 (1-C, 13-C). **IR (KBr)**: 1742 (CO), 1635 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 732 (100) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 732.3829, berechnet für C₄₄H₅₄N₃O₅Si⁺: 732.3827, **R_f**: 0.10 (CH/EE, 8:2).

3.22 (*S*)-2-((3*S*,6*S*)-6-(((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)-3-isopropyl-2-oxopiperazin-1-yl)-3-(1*H*-indol-3-yl)propansäuremethylester (128, TZD-254)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.85 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 16-H), 0.95 (s, 9H, 26-H), 0.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 17-H), 2.53 (m, 1H, 15-H), 2.77-2.79 (m, 2H, 20-H), 2.91 (dd, *J* = 4.5 Hz, *J* = 13.4 Hz, 1H, 18-H), 3.05 (dd, *J* = 4.0 Hz, *J* = 13.4 Hz, 1H, 18-H), 3.10 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, 14-H), 3.19 (m, 1H, 19-H), 3.44 (dd, *J* = 4.4 Hz, *J* = 15.0 Hz, 1H, 3-H), 3.54 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 15.0 Hz, 1H, 3-H), 3.70 (s, 3H, 28-H), 3.74 (dd, *J* = 5.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, 1H, 2-H), 6.9 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, 5-H), 6.99 (ddd, *J* = 1.3 Hz, *J* = 6.7 Hz, *J* = 7.9 Hz, 1H, 10-H), 7.10 (ddd, *J* = 1.0 Hz, *J* = 6.7 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1H, 9-H), 7.14 (m, 1H, 8-H), 7.36-7.52 (m, 12H, 6-H, 11-H, 22-H, 23-H, 24-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 17.1 (16-C), 18.9 (25-C), 19.9 (17-C), 24.1 (3-C), 26.7 (26-C), 30.6 (15-C), 43.8 (18-C), 52.0 (28-C), 60.9 (19-C), 61.2 (20-C), 62.5 (14-C), 63.5 (2-C), 111.0 (8-C), 112.8 (4-C), 118.6 (11-C), 119.4 (9-C), 122.0 (10-C), 122.4 (5-C), 127.7, 127.7 (23-C), 129.8, 129.8 (24-C), 133.0, 133.2 (21), 135.6 (22-C), 135.7 (7-C), 171.2, 171.9 (1-C, 13-C). **IR (KBr)**: 1636 (CO), 1744 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 612 (100) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 612.3250, berechnet für C₃₆H₄₆N₃O₄Si⁺: 612.3252. **R_f**: 0.10 (CH/EE, 7:3).

3.23 (4*S*,7*S*,9*aS*)-4-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-7-isopropyl-8-(4-methoxybenzyl)tetra-hydropyrazino[2,1-*c*]-[1,4]oxazine-3,6(1*H*,4*H*)-dion (**130**, TZD-198)



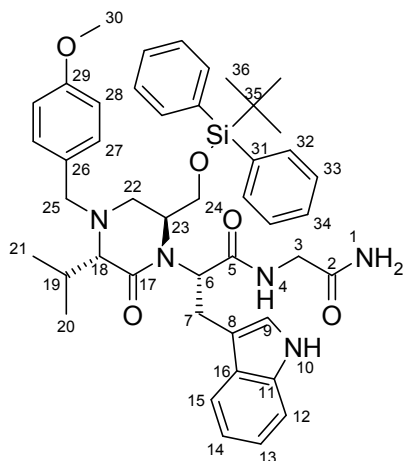
Der Silylether **125** (289 mg, 394 μmol) wird in THF (20 mL) gelöst und mit Magnesiumsulfat (319 mg, 2.65 mmol) versetzt. Anschließend wird TBAF (185 mg, 586 μmol) hinzugegeben und der Ansatz für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 8:2) wird das Lacton **130** (52 mg, 113 μmol , 29 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN): δ = 0.87 (d, J = 6.8 Hz, 3H, 16-H), 1.01 (d, J = 6.8 Hz, 3H, 17-H), 2.11 (m, 1H, 15-H), 2.22 (m, 1H, 19-H), 2.33 (dd, J = 13.3 Hz, J = 5.2 Hz, 1H, 18-H), 2.79 (d, J = 5.5 Hz, 1H, 14-H), 3.02 (dd, J = 13.4 Hz, J = 5.5 Hz, 1H, 18-H), 3.36 (dd, J = 14.6 Hz, J = 5.8 Hz, 1H, 3-H), 3.44 (dd, J = 14.8 Hz, J = 5.9 Hz, 1H, 3-H), 3.48 (m, 1H, 19-H), 3.53 (d, J = 13.4 Hz, 1H, 21-H),

3.78 (s, 3H, 26-H), 3.79 (d, J = 13.3 Hz, 1H, 21-H), 4.06 (dd, J = 11.3 Hz, J = 3.9 Hz, 1H, 20-H), 4.29 (dd, J = 11.3 Hz, J = 9.4 Hz, 1H, 20-H), 5.47 (ψ t, J = 5.8 Hz, 1H, 2-H), 6.88 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 24-H), 7.06 (d ψ t, J = 7.3 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, 10-H), 7.12 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 8-H), 7.15 (d ψ t, J = 7.1 Hz, J = 1.1 Hz, 1H, 9-H), 7.20 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 23-H), 7.41 (d, J = 8.1 Hz, 1H, 5-H), 7.64 (d, J = 8.1 Hz, 1H, 11-H), 9.2 (s, 1H, 6-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): δ = 19.8 (16-C), 21.3 (17-C), 28.5 (3-C), 29.9 (15-C), 46.5 (18-C), 49.8 (19-C), 54.8 (2-C), 55.8 (26-C), 59.1 (21-C), 69.8 (14-C), 71.2 (20-C), 110.7 (4-C), 112.3 (8-C), 114.6 (24-C), 119.7 (11-C), 119.9 (10-C), 122.6 (9-C), 125.1 (5-C), 128.5 (12-C), 130.9 (23-C), 131.4 (22-C), 137.3 (7-C), 159.9 (25-C), 169.1 (1-C), 169.9 (13-C). IR (KBr): 1649 (CO), 1733 (CO) cm^{-1} . HPLC-ESI-MS: m/z (%) = 462 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. HR-ESI-MS: m/z = 462.2399, berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4^+$: 462.2387. R_f : 0.28 (CH/EE, 1:1).

3.24 (*S*)-*N*-(2-Amino-2-oxoethyl)-2-((3*S*,6*S*)-6-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-3-isopropyl-4-(4-methoxybenzyl)-2-oxopiperazin-1-yl)-3-(1*H*-indol-3-yl)propan-amid (**133**, TZD-217)

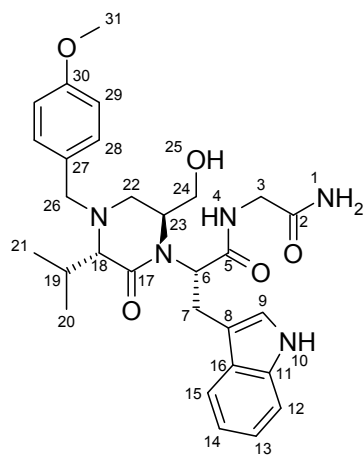
Der Methylesters **125** (973 mg, 1.33 mmol) wird mit einer auf 0 °C vorgekühlten Lösung von LiOH (469 mg, 19.6 mmol) in THF/MeOH/ H_2O (100 mL, 3:1:1) versetzt und für 19 h gerührt. Anschließend wird Wasser (100 mL) hinzugegeben, mit 1M HCl auf pH 3 angesäuert und die Säure **132** mit DCM (1x 200 mL, 2x 100 mL) als Hydrochlorid extrahiert. Nach Waschen mit gesättigter Natriumchloridlösung (100 mL) und Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet. Die Säure **132** wird in trockenem DMF (80 mL) gelöst und mit Glycinamid-Hydrochlorid (458 mg, 4.14 mmol) und HATU (1.11 g, 2.93 mmol) versetzt. Bei 0 °C wird DIPEA (1.6 mL, 9.41 mmol) hinzugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur für 7 h gerührt. Nach Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (25 mL) wird mit DCM (4x, 100 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM/Aceton, 8:2) wird das Peptid **133** (760 mg, 982 μmol , 74 %) als farbloser Schaum erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.89 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 20-H), 0.96 (s, 9H, 26-H), 1.02 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 21-H), 2.28 (m, 1H, 19-H), 2.76 (dd, *J* = 13.0 Hz, *J* = 3.9 Hz, 1H, 22-H), 3.03 (dd, *J* = 12.9 Hz, 1H, 22-H), 3.18 (m, 2H, 18-H, 7-H), 3.30-3.37 (m, 2H, 7-H, 24-H), 3.52-3.59 (m, 2H, 23-H, 24-H), 5.56 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, 25-H), 3.65 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, 25-H), 3.68 (dd, *J* = 16.6 Hz, *J* = 5.6 Hz, 1H, 3-H), 3.79 (s, 3H, 30-H), 3.81 (dd, *J* = 16.9 Hz, *J* = 5.6 Hz, 1H, 3-H) 4.55 (ψs, br, 1H, 6-H), 5.43 (s, br, 1H, 1-H), 6.53 (s, br, 1H, 1-H), 6.74 (s, 1H, 9-H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 28-H), 7.07 (ψt, *J* = 7.4 Hz, 1H, 13-H), 7.12 (m, 1H, 4-H), 7.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, 27-H), 7.17 (ψt, *J* = 7.4 Hz, 1H, 14-H), 7.28 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, 12-H), 7.38 (m, 4H, 33-H), 7.42-7.46 (m, 3H, 34-H, 15-H), 7.53 (m, 4H, 32-H), 8.21 (s, 10-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃):

δ = 18.4 (35-C), 19.0, 19.7 (20-C, 21-C), 23.6 (7-C), 26.7 (36-C), 29.5 (19-C), 43.0 (3-C), 46.2 (22-C), 55.2 (30-C), 57.8 (23-C, 25-C), 60.6 (br, 6-C), 62.5 (24-C), 68.8 (18-C), 110.9 (8-C), 111.3 (12-C), 113.7 (28-C), 118.4 (15-C), 119.6 (13-C), 122.1 (14-C), 122.7 (9-C), 127.0 (16-C), 127.7, 127.8 (33-C), 129.8, 129.9 (27-C, 34-C), 130.4 (26-C), 133.0, 133.1 (31-C), 135.5, 135.5 (32-C), 136.0 (11-C), 158.7 (29-C), 171.6, 171.7, 173.0 (2-C, 5-C, 17-C). **IR (KBr)**: 1670 (CO), 1627 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 774 (100) [M+H]⁺, 796 (11) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 774.4045, berechnet für C₄₅H₅₆N₅O₅Si⁺: 774.4045; *m/z* = 796.3861, berechnet für C₄₅H₅₅N₅NaO₅Si⁺: 796.3865. **R_f**: 0.16 (DCM/Aceton, 7:3).

3.25 (S)-N-(2-Amino-2-oxoethyl)-2-((3S,6S)-6-(hydroxymethyl)-3-isopropyl-4-(4-methoxybenzyl)-2-oxopiperazin-1-yl)-3-(1H-indol-3-yl)propanamide (134, TZD-218)

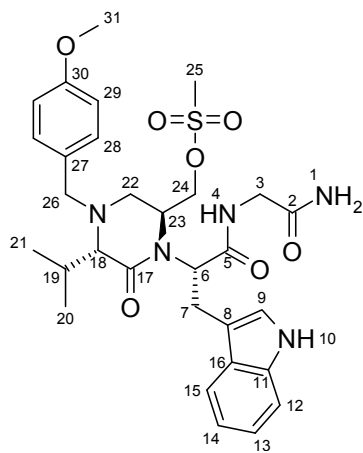


Der Silylether **133** (395 mg, 511 μmol) wird in THF (10 mL) gelöst und bei 0 °C mit einer 1 M TBAF-Lösung in THF (1.4 mL, 1.4 mmol) versetzt. Nach Rühren für 13 h wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (15 mL) hinzugegeben und mit Dichlormethan (4x 15 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (DCM/ACETON, 1:1) wird der Alkohol **134** (233 mg, 435 μmol, 85%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.71 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 20-H), 1.02 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 21-H), 2.25 (m, 1H, 19-H), 2.69 (dd, *J* = 12.7 Hz, *J* = 3.1 Hz, 1H, 22-H), 2.92 (dd, *J* = 12.7 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H, 22-H), 3.23 (dd, *J* = 9.7 Hz, *J* = 15.4 Hz, 1H, 7-H), 3.30 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 18-H), 3.51-3.57 (m, 3H, 7-H, 24-H, 26-H), 3.60-3.67 (m, 3H, 3-H, 23-H, 24-H), 3.80-3.83 (m, 4H, 26-H, 31-H), 4.17 (dd, *J* = 7.0 Hz, *J* = 17.2 Hz, 1H, 3-H), 5.44 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J* = 6.8 Hz, 1H, 6-H), 5.86 (s, 1H, 1-H), 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 29-H), 7.04 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 9-H), 7.07-7.11 (m, 3H, 14-H, 28-H), 7.17 (s, br, 1-H) 7.18 (ψt, *J* = 7.3 Hz, 1H, 13-H), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 12-H), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 15-H), 7.72 (ψt, *J* = 5.5 Hz, 1H, 4-H), 8.38 (s, 1H, 10-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 19.7, 22.8 (20-C, 21-C), 23.2 (7-C), 27.3 (19-C), 43.0 (3-C), 48.9 (22-C), 52.9 (23-C), 55.2 (31-C), 56.6 (24-C), 56.7 (6-C), 64.8 (26-C), 68.6 (18-C), 110.6 (8-C), 111.4 (12-C), 114.1 (29-C), 118.2 (15-C), 119.7 (14-C), 122.3 (13-C), 122.5 (9-C), 126.9 (16-C), 128.8 (27-C), 130.0 (28-C), 136.2 (11-C), 159.2 (30-C), 172.0, 172.6,

172.7 (2-C, 5-C, 17-C). **IR (KBr):** 1624 (CO), 1670 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 536 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 536.2863, berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_5^+$: 536.2867. **R_f:** 0.22 (DCM/Aceton, 1:1).

3.26 Methansulfonsäure-((2*S*,5*S*)-1-((*S*)-1-(2-Amino-2-oxoethylamino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)-5-isopropyl-4-(4-methoxybenzyl)-6-oxopiperazin-2-yl)methylester (**135**, TZD-219)

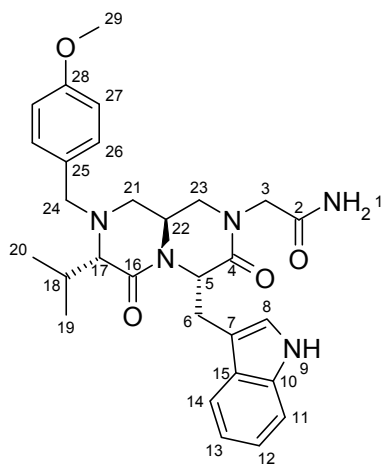


Der Alkohol **134** (214 mg, 399 μmol) wird in Dichlormethan (10 mL) gelöst. Bei 0 °C wird TEA (200 μl) und Mesylchlorid (100 μl) hinzugegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 3 h gerührt. Nach Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (15 mL) und Dichlormethan (10 mL) werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wird mit Dichlormethan (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Trocknen des Rohprodukts im Hochvakuum wird in quantitativer Ausbeute das Mesylat **135** (248 mg, 399 μmol) als gelber Feststoff erhalten. Das Rohprodukt wird für die nachfolgende Cyclisierung ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 0.86 (d J = 6.8 Hz, 3H, 20-H), 1.01 (d, J = 6.9 Hz, 3H, 21-H), 2.99 (m, 1H, 18-H), 2.70 (dd, J = 2.9 Hz, J = 13.2 Hz, 1H, 22-H), 2.79 (s, 3H, 25-H), 3.04 (dd, J = 3.8 Hz, J = 13.3 Hz, 1H, 22-H), 3.28 d, J = 2.7 Hz, 1H, 18-H), 3.41 (dd, J = 8.3 Hz, J = 14.9 Hz, 1H, 7-H), 3.50 (dd, J = 7.3 Hz, J = 14.8 Hz, 1H, 7-H), 3.65 (s, 2H, 26-H), 3.80 (s, 3H, 31-H), 3.82 (m, 1H, 23-H), 3.83 (dd, J = 5.9 Hz, J = 16.9 Hz, 1H, 3-H), 3.91 (dd, J = 6.1 Hz, J = 16.9 Hz, 1H, 3-H), 4.02 (qt, J = 9.7 Hz, 1H, 24-H), 4.21 (ψ d, J = 8.8 Hz, 1H, 24-H), 4.92 (ψ t, J = 7.9 Hz, 1H, 6-H), 5.58 (s, 1H, 1-H), 6.40 (s, 1H, 1-H), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 28-H), 7.09 (d, J = 2.01 Hz, 1H, 9-H), 7.12-7.17 (m, 3H, 14-H, 29-H), 7.19-7.25 (m, 3H, 4-H, 13-H), 7.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 12-H), 7.57 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 15-H), 8.53 (s, 1H, 10-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl_3): δ = 19.9, 20.3 (20-C, 21-C), 23.7 (7-C), 28.8 (19-C), 36.9 (25-C), 42.9 (3-C), 45.1 (22-C), 54.1 (br, 23-C), 55.2 (31-C), 57.1 (26-C), 59.7 (br, 6-C), 67.4 (24-C), 68.2 (18-C), 110.4 (8-C), 111.5 (12-C), 113.8 (29-C), 118.4 (15-C), 119.9 (14-C), 122.4 (13-C), 123.1 (9-C), 127.0 (16-C), 129.9 (27-C), 130.0 (28-C), 136.3 (11-C), 159.0 (30-C), 171.2, 171.8, 172.6 (2-C, 5-C, 17-C). **IR (KBr):** 1673 (CO), 1633 (CO), 1355 (SO_2), 1174 (SO_2) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 614 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 636 (28) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 636.2468, berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{NaO}_7\text{S}^+$: 636.2462. **R_f:** 0.24 (DCM/Aceton, 1:1).

3.27 2-((4*S*,7*S*,9*aS*)-4-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-7-isopropyl-8-(4-methoxybenzyl)-3,6-dioxohexahydroxyo-1*H*-pyrazino[1,2-*a*]pyrazin-2(6*H*)-yl)acetamid (**136**, TZD-220)

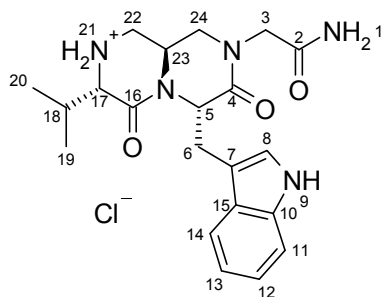
Das Rohprodukt des Mesylats **135** (248 mg, 399 μmol) wird in DMF (15 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (27.0 mg, 1.13 mmol) versetzt. Nach Rühren für 6.5 h bei Raumtemperatur wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (15 mL) hinzugegeben. Das Gemisch wird anschließend mit Dichlormethan (4x 15 mL) extrahiert. Nach Trocknen der vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat, Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung (DCM/Aceton, 1:1) wird der Bicyclus **136** (112 mg, 217 μmol , 57 %) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): □ = 1.04 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 19-H), 1.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 20-H), 2.20 (m, 2H, 18-H, 21-H), 2.82 (dd, *J* = 3.7 Hz, *J* = 11.6 Hz, 1H, 23-H), 2.96 (dd, *J* = 5.4 Hz, *J* = 13.0 Hz, 1H, 21-H), 3.02 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, 17-H), 3.30 (m, 1H, 22-H), 3.36 (dd, *J* = 4.8 Hz, *J* = 14.0 Hz, 1H, 6-H), 3.47 (vt, *J* = 11.2 Hz, 1H, 23-H), 3.53 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, 3-H), 3.55 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, 24-H), 3.67 (dd, *J* = 4.8 Hz, *J* = 14.8 Hz, 1H, 6-H), 3.76 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, 24-H), 3.80 (s, 3H, 29-H), 4.36 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, 3-H), 5.21 (s, br, 1-H), 5.52 (vt, *J* = 4.8 Hz, 1H, 5-H), 5.76 (s, br 1H, 1-H), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 27-H), 7.08-7.21 (m, 5-H, 8-H, 12-H, 13-H, 26-H), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 11-H), 7.69 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 14-H), 8.30 (s, 9-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 20.1,

21.8 (19-C, 20-C), 27.3 (6-C), 28.2 (18-C), 45.6 (21-C), 49.4 (22-C), 50.5 (3-C), 52.4 (23-C), 55.1 (5-C), 55.2 (29-C), 58.2 (24-C), 68.9 (17-C), 110.7 (7-C), 111.4 (11-C), 113.8 (27-C), 119.0 (14-C), 119.5 (13-C), 122.0 (12-C), 123.8 (8-C), 127.6 (15-C), 129.6 (25-C), 129.8 (26-C), 136.0 (10-C), 158.9 (28-C), 168.4 (17-C), 169.0 (4-C), 170.5 (2-C). **IR (KBr)**: 1647 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 518 (100) [M+H]⁺, 536 (9), [M+NH₄]⁺, 540 (16) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 518.2758, berechnet für C₂₉H₃₆N₅O₄⁺: 518.2762. **R_f**: 0.25 (DCM/Aceton, 1:1).

3.28 2-((4*S*,7*S*,9*aS*)-4-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-7-isopropyl-3,6-dioxohexahydro-1*H*-pyrazino[1,2-*a*]pyrazin-2(6*H*)-yl)acetamid (**84**, TZD-221)



a) Das PMB-geschützte Amin **136** (100 mg, 193 μmol) wird in (Ethanol 10 mL) gelöst und mit Pd(OH)₂/C (33.2 mg) versetzt. Anschließend wird 10 min Argon gefolgt von 10 min Wasserstoff durch die Reaktionslösung geleitet und danach 2 Tage unter Wasserstoffatmosphäre bei 1 bar gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in einen Autoklaven überführt und 22.5 h unter 2 bar Wasserstoffatmosphäre gefolgt von weiteren 46 h unter 3 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach dieser Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch über 2 Faltenfilter filtriert und das Lösungsmittel

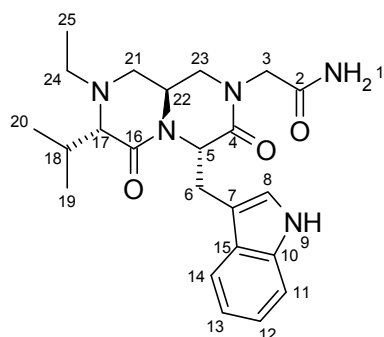
am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Reinigung mittels Kieselgelchromatographie (EE/EtOH, 9:1 + 0.1 % TEA – EE/EtOH 1:1 + 0.1 % TEA) werden 43 % des Edukts **136** (42.5 mg, 82.1 μmol) reisoliert, 29 % des Produkts **84** (21.9 mg, 55.1 μmol) sowie 15 % des alkylierten Bicyclus **137** (12.5 mg, 29.3 μmol) erhalten.

b) Das PMB-geschützte Amin **136** (232 mg, 448 μmol) wird in MeOH (15 mL) gelöst und mit Pd(OH)₂/C (37.8 mg) versetzt. Dazu werden zwei Tropfen konzentrierte Salzsäure gegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur unter 5 bar Wasserstoffdruck gerührt. Nach 14 h wird weiteres Pd(OH)₂/C (73.6 mg) hinzugegeben und erneut für 23.5 h bei 5 bar Wasserstoffdruck hydrogenolysiert. Anschließend wird über zwei Filterpapiere filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der entschützte Bicyclus **84** (186.1 mg, 429 μmol, 96%) wird als rötlicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 0.86 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 19-H), 0.90 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, 20-H), 2.25 (m, 1H, 18-H), 3.18-3.25 (m, 3H, 6-H, 24-H), 3.42 (dd, *J* = 3.9 Hz, *J* = 12.5 Hz, 1H, 22-H), 3.50 (vt, *J* = 11.0 Hz, 1H, 22-H), 3.57 (dd, *J* = 4.4 Hz, *J* = 12.4 Hz, 1H, 22-H), 3.68 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, 3-H), 3.82 (m, 1H, 17-H), 4.13 (d,

$J = 16.4$ Hz, 1H, 3-H), 4.22 (m, 1H, 23-H), 5.13 (q, $J = 6.0$ Hz, 1H, 5-H), 6.97 (ddd, $J = 0.5$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 7.4$ Hz, 1H, 13-H), 7.05 (ddd, $J = 0.8$ Hz, $J = 7.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1H, 12-H), 7.11 (s, br, 1H, 1-H), 7.27 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 8-H), 7.31 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 11-H), 7.45 (s, br, 1H, 1-H), 7.56 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 14-H), 9.50 (s, br, 1H, 21-H), 10.00 (s, br, 1H, 21-H), 10.79 (s, 1H, 9-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO): $\delta = 17.7$, 18.3 (19-C, 20-C), 27.3 (6-C), 28.3 (18-C), 40.0 (24-C), 45.9 (br, 23-C), 48.9 (3-C), 50.4 (22-C), 54.3 (5-C), 54.8 (), 61.1 (17-C), 109.0 (7-C), 111.2 (11-C), 118.2, 118.3 (13-C, 14-C), 120.8 (12-C), 124.7 (8-C), 127.3 (15-C), 136.2 (10-C), 167.0, 169.2 (2-C, 4-C, 16-C). **IR (KBr):** 1657 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 398 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 420 (51) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** $m/z = 420.2007$, berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{NaO}_3$: 420.006. **R_f:** 0.18 (EE/EtOH, 1:1).

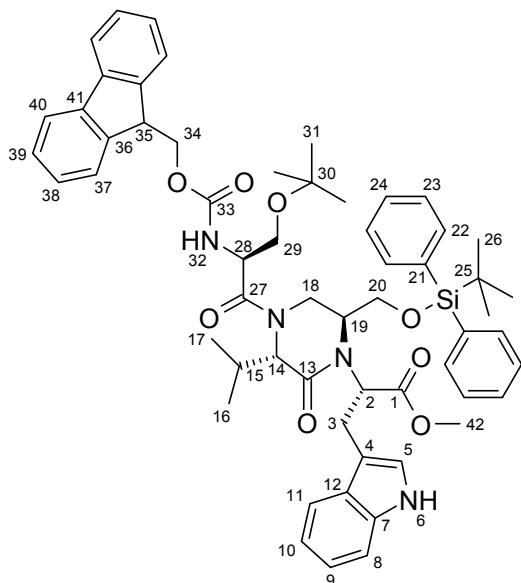
3.29 2-((4*S*,7*S*,9*aS*)-4-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-8-ethyl-7-isopropyl-3,6-dioxohexahydro-1*H*-pyrazino[1,2-*a*]pyrazin-2(6*H*)-yl)acetamid (137, TZD-255)



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeCN): $\delta = 0.72$ (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 19-H), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 20-H), 0.98 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, 25-H), 1.91 (m, 1H, 17-H), 2.46 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 13.8$ Hz, 1H, 23-H), 2.61 (dq, $J = 7.2$ Hz, $J = 12.8$ Hz, 1H, 24-H), 2.69 (dq, $J = 7.0$ Hz, $J = 12.7$ Hz, 1H, 24-H), 2.78 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, 17-H), 3.09 (dd, $J = 4.7$ Hz, $J = 13.6$ Hz, 1H, 23-H), 3.14 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H, 21-H), 3.30 (dd, $J = 4.9$ Hz, $J = 14.7$ Hz, 1H, 6-H), 3.39 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 14.7$ Hz, 1H, 6-H), 3.55-3.59 (m, 2H, 22-H, 21-H), 3.90 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, 3-H), 3.98 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, 3-H), 5.32 (dd, $J = 5.1$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1H, 5-H), 5.77 (s, br 1H, 1-H), 6.16 (s, br 1H, 1-H), 7.06 (dq, $J = 0.9$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1H, 13-H), 7.11 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, 8-H), 7.13 (dq, $J = 0.8$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 1H, 12-H), 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 11-H), 7.62 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 14-H), 9.17 (s, 1H, 9-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeCN): $\delta = 13.4$ (25-C), 20.2 (19-C), 21.9 (20-C), 27.8 (6-C), 29.2 (18-C), 46.7 (21-C), 49.6 (24-C), 49.9 (22-C), 50.5 (3-C), 53.0 (23-C), 55.4 (5-C), 69.4 (17-C), 111.3 (7-C), 112.2 (11-C), 119.7 (14-C), 119.8 (13-C), 122.3 (12-C), 125.1 (8-C), 128.8 (15-C), 137.4 (10-C), 169.1, 169.7, 170.9 (2-C, 4-C, 16-C). **IR (KBr):** 1654 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 426 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** 426.2507; berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_3^+$: 426.2500. **R_f:** 0.65 (EE/EtOH, 1:1).

3.30 (*S*)-2-((3*S*,6*S*)-4-((*S*)-2-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(*tert*-butoxy)propanoyl)-6-(((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)-3-isopropyl-2-oxopiperazin-1-yl)-3-(1*H*-indol-3-yl)propansäuremethylester (139, TZD-223)

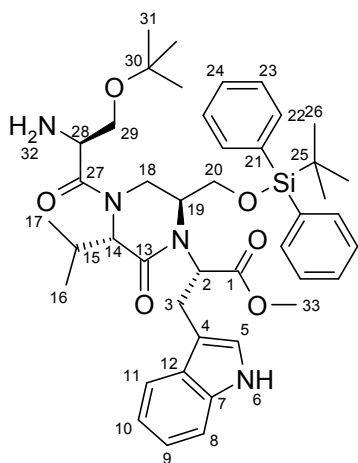
Das 2-Ketopiperazin **128** (786 mg, 1.28 mmol) wird in DMF (10 mL) gelöst und dazu Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (1.26 g, 3.29 mmol) und HATU (1.08 g, 2.84 mmol) gegeben. Nach Zugabe von DIPEA (750 μl , 4.41 mmol) wird der Ansatz für 21.5 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wird Wasser (40 mL) zugesetzt und die resultierende Lösung einmal mit DCM (1x 100 mL, 3x 50 mL) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat, Entfernen des Lösungsmittel unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 8:2) wird das Produkt **139** (874 mg, 894 μmol , 70 %) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 16-H), 0.98 (s, 9H, 26-H), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 17-H), 1.16 (s, 9H, 31-H), 2.39 (m, 1H, 15-H), 2.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 20-H), 2.73 (m, 2H, 19-H, 20-H), 2.92 (m, 1H, 2-H), 3.04 (dd,) 3.30-3.60 (m, 5-H, 3-H, 18-H, 29-H), 3.67 (s, 3H, 42-H), 4.24-4.48 (m, 3H, 35-H, 34-H), 4.61 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, 18-H), 4.85 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, 14-H), 4.90 (m, 1H, 28-H), 5.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, 32-H), 6.62 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, 5-H), 6.85-7.79 (m, 24H, 6-H, 8-H, 9-H, 10-H, 11-H, 22-H, 23-H, 24-H, 37-H, 38-H, 39-H, 40-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 18.9 (25-C), 19.6, 20.1 (16-C, 17-C), 23.8 (3-C), 26.8 (26-C), 27.4 (31-C), 32.6 (15-C), 41.3 (18-C), 47.1 (35-C), 49.9 (28-C), 52.1 (42-C), 59.1 (20-C), 59.6 (19-C), 59.9 (14-C), 61.6 (29-C), 63.9 (br, 2-C), 67.1

(34-C), 77.2 (30-C), 111.0 (8-C), 112.3 (4-C), 118.4 (11-C), 119.5 (10-C), 122.0 (9-C), 122.2 (5-C), 119.6, 120.0, 122.4, 125.0, 125.1, 127.0, 127.0, 127.2, 127.3, 127.5, 127.7, 127.7, 127.8, 129.4, 129.8, 130.1, 132.7, 133.1 (12-C, 22-C, 23-C, 24-C, 37-C, 38-C, 39-C, 40-C), 135.6, 135.6, 135.8 (7-C, 21-C), 141.2 (41-C), 143.8 (36-C), 155.8 (33-C), 169.4, 170.2, 170.4 (1-C, 13-C, 33-C). **IR (KBr):** 1654 (CO), 1735 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 977 (100) [M+H]⁺, 999 (14) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS:** *m/z* = 999.4699, berechnet für C₅₈H₆₈N₄NaO₈Si⁺: 999.4699. **R_f:** 0.44 (CH/EE, 1:1).

3.31 (S)-2-((3S,6S)-4-((S)-2-Amino-3-(*tert*-butoxy)propanoyl)-6-(((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)-3-isopropyl-2-oxopiperazin-1-yl)-3-(1*H*-indol-3-yl)pro-pansäuremethylester (TZD-228)



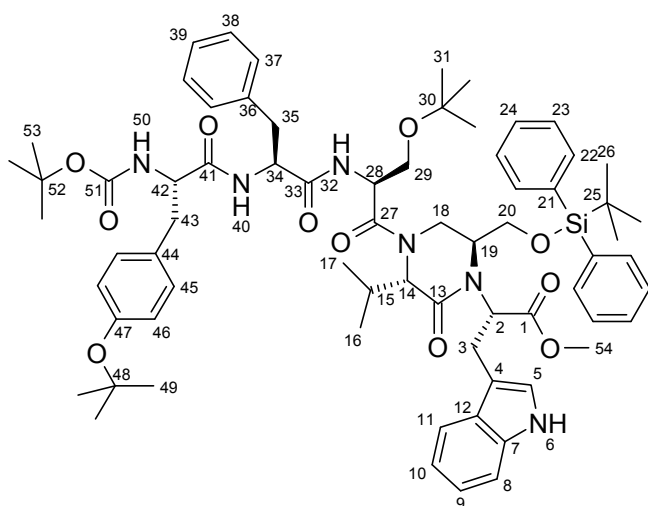
Das Carbamat **139** (845 mg, 865 μmol) wird in DMF (10 mL) gelöst und mit Piperidin (860 μl, 8.69 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 2 h wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (10 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit DCM (4x 10 mL) extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Dichlormethan unter vermindertem Druck wird das restliche DMF im Hochvakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 1:1) wird das Amin (565 mg, 748 μmol, 87 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (s, 9H, 26-H), 0.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 16-H), 1.07 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 17-H), 1.14 (s, 9H, 31-H), 2.38-2.54 (m, 2H, 15-H, 20-H), 2.61 (ψt, *J* = 11.0 Hz, 1H, 20-H), 2.80 (m, 1H, 19-

H), 3.15 (dd, *J* = 2.9 Hz, *J* = 10.2 Hz, 1H, 2-H), 3.28-3.43 (m, 3-H, 29-H), 3.47-3.54 (m, 2H, 18-H, 29-H), 3.71 (s, 3H, 33-H), 3.93 (dd, *J* = 3.8 Hz, *J* = 9.1 Hz, 1H, 28-C), 4.51 (ψd, *J* = 14.5 Hz, 1H, 18-H), 4.88 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, 14-H), 6.59 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, 5-H), 6.94 (ddd, *J* = 1.1 Hz, *J* = 6.9 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, 10-H), 7.01-7.11 (m, 2H, 8-H, 9-H), 7.26-7.56 (m, 12H, 6-H, 11-H, 22-H, 23-H, 24-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 18.8 (25-C), 19.5 (16-C), 20.1 (17-C), 23.8 (3-C), 26.7 (26-C), 27.5 (31-C), 32.7 (15-C), 41.3 (18-C), 51.7 (28-C), 52.2 (33-C), 58.9 (20-C), 59.3 (14-C), 59.8 (19-C), 64.3 (2-C), 64.9 (29-C), 77.2 (30-C), 111.9 (8-C), 112.1 (4-C), 118.2 (11-C), 119.7 (10-C), 122.1 (9-C), 122.4 (5-C), 127.2 (12-C), 127.7, 127.8, 129.8, 130.0, 135.4, 135.6 (22-

C, 23-C, 24-C), 132.6, 132.9 (21-C), 135.6 (7-C), 169.6, 170.5, 172.5 (1-H, 13-H, 27-H). **IR (KBr):** 1654 (CO), 1744 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 755 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 755.4198, berechnet für $\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_6\text{Si}^+$: 755.4198. **R_f:** 0.17 (CH/EE, 1:1).

3.32 (S)-2-((3S,6S)-4-((6S,9S,12S)-9-Benzyl-6-(4-(tert-butoxy)benzyl)-12-(tert-butoxymethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oyl)-6-(((tert-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-3-isopropyl-2-oxopiperazin-1-yl)-3-(1H-indol-3-yl)propansäuremethylester (140, TZD-230)

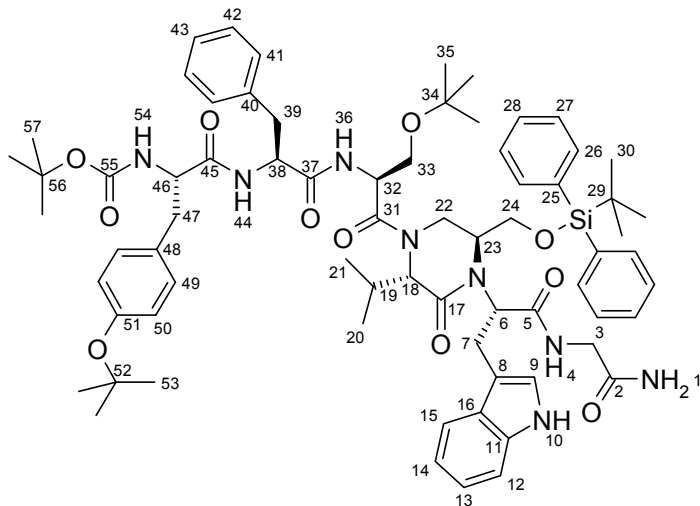


Das Amin (549 mg, 727 μmol) wird in MeCN (10 mL) gelöst und mit der Dipeptidsäure **239** (453 mg, 934 μmol), HATU (454 mg, 930 μmol) und DIPEA (300 μl , 1.72 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 17.5 h wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (20 mL) hinzugegeben und die Lösung mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat und Reinigung mittels Kieselgelchromatographie (CH/EE, 1:1) wird das Peptid **140** (792 mg, 648 μmol , 89%) als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3):⁴ δ = 0.95 (d, J = 6.9 Hz, 3H, 16-H), 1.06 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 17-H), 1.00, 1.11, 1.35, 1.35 (jeweils s, 36 H, 26-H, 31-H, 49-H, 53-H), 2.31 (m, 1H, 15-H), 2.60 (dd, J = 2.3 Hz, J = 11.6 Hz, 1H, 20-H), 2.70-3.15 (m, 7-H, 2-H, 19-H, 20-H, 35-H, 43-H), 3.29-3.42 (m, 4-H, 3-H, 18-H, 29-H), 3.54 (m, 1H, 29-H), 3.67 (s, 3H, 54-H), 4.23 (dd, J = 6.7 Hz, J = 13.1 Hz, 1H, 42-H), 4.49 (d, J = 14.4 Hz, 1H, 18-H), 4.62-4.86 (m, 2H, 34-H, 50-H), 4.78 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 14-H), 5.06 (ψ dd, J = 6.7 Hz, J = 14.2, 1H, 28-H), 6.43 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 40-H), 6.51 (d, J = 7.2 Hz, 1H, 32-H), 6.62 (d, J = 2.2 Hz, 1H, 5-H), 6.92-7.01 (m, 3H, 10-H, 46-H), 7.06-7.55 (m, 20H, 8-H, 9-H, 11-H, 22-H, 23-H, 24-H, 37-H, 38-H, 39-H, 45-H), 7.57 (s, 1H, 6-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl_3): δ = 14.1 (25-C), 18.9 (16-C), 19.9 (17-C), 23.8 (3-C), 26.8, 27.4, 28.2, 28.8 (26-C, 31-C, 49-C, 53-C), 32.5 (15-C), 37.0 (43-C), 37.7 (45-C), 41.2 (18-C), 48.6 (28-C), 52.0 (54-C), 53.9 (34-C), 55.9 (42-C), 59.2 (20-C), 59.3 (19-C), 60.0 (14-C), 61.3 (29-C), 63.4 (2-C), 73.3, 78.4, 80.6 (30-C, 48-C, 52-C), 111.0 (8-C), 112.2 (4-C), 118.4 (11-C), 119.6 (10-C), 122.1 (11-C), 122.6 (5-C), 124.3 (46-C), 124.5, 127.6, 127.6, 127.8, 128.6, 129.3, 130.0, 135.7, 135.8 (22-C, 23-C, 24-C, 37-C, 38-C, 39-C), 127.2 (12-C), 129.7 (45-C), 130.9 (44-C), 132.8, 133.2 (21-C), 135.9 (36-C), 136.1 (7-C), 154.6 (47-C), 155.6 (51-C), 169.2, 169.4, 169.8, 170.5, 170.9 (1-C, 13-C, 27-C, 33-C, 41-C). **IR (KBr):** 1655 (CO), 1743 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 1221 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 1243.6497, berechnet für $\text{C}_{70}\text{H}_{92}\text{N}_6\text{NaO}_{11}\text{Si}^+$: 1243.6486. **R_f:** 0.28 (CH/EE, 1:1).

⁴ cis/trans-Isomerie um tertiäres Amid (3:1), Angabe des Hauptisomers

3.33 ((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-((2S,5S)-4-((S)-1-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)-5-(((tert-butyl)diphenylsilyloxy)methyl)-2-iso-propyl-3-oxopiperazin-1-yl)-3-(tert-butoxy)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenyl-propan-2-yl)amino)-3-(4-(tert-butoxy)phenyl)-1-oxopropan-2-yl)carbamidsäure-*tert*-Butylester (141, TZD-232)

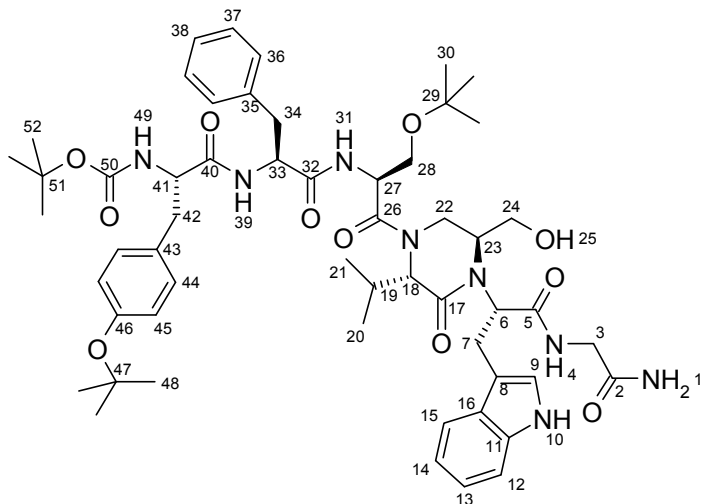


Das Peptid **140** (752 mg, 616 μmol) wird in 50 mL einer auf 0 °C gekühlten Lösung von LiOH (173 mg, 7.22 mmol) in THF/MeOH/H₂O (3:1:1, 50 mL) gelöst und die Mischung für 13 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Salzsäure auf pH 3 angesäuert und mit Dichlormethan (3x 40 mL) extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird die freie Säure über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird das Rohprodukt in 40 mL DMF gelöst und mit

Glycinamid-Hydrochlorid (348 mg, 3.16 mmol) versetzt. Zu diesem Gemisch wird HATU (785 mg, 2.07 mmol) und DIPEA (750 μl , 4.41 mmol) gegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 15 h wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (50 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit Dichlormethan (4x 30 mL) extrahiert. Säulenchromatographischer Reinigung (EE) liefert das Peptid **141** (695 mg, 550 μmol , 89 %) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (d, J = 6.1 Hz, 3H, 20-H), 1.05 (d, J = 7.1 Hz, 3H, 21-H), 1.06-1.36 (m, 36H, 30-H, 35-H, 53-H, 57-H), 2.01-2.14 (m, 1H, 19-H), 2.56-5.11 (m, 20H, 3-H, 6-H, 7-H, 18-H, 22-H, 23-H, 24-H, 32-H, 33-H, 38-H, 39-H, 46-H, 47-H), 5.45, 5.47 (s, 1H, 1-H), 6.09-7.49 (m, 25H, 1-H, 4-H, 9-H, 12-H, 13-H, 14-H, 15-H, 27-H, 28-H, 36-H, 41-H, 42-H, 43-H, 44-H, 49-H, 50-H, 54-H), 7.54-7.69 (m, 4H, 26-H), 8.20 (s, br, 10-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 14.0, 14.2 (29-C), 19.8, 20.0, 20.2 (20-C, 21-C), 22.4 (br), 23.5 (br, 7-C), 26.9, 27.0, 27.3, 27.4, 28.1, 28.2, 28.8, 29.7, (30-C, 35-C, 53-C, 57-C), 31.3 (br), 32.5 (br, 19-C), 36.5, 36.6, 38.0 (39-C, 47-C), 41.1, 43.0, 43.3 (3-C, 22-C), 48.8, 48.8, 50.0, 50.8, 53.8, 54.0, 55.6, 55.8, 56.1 (6-C, 23-C, 32-C, 38-C, 46-C), 59.9 (br, 18-C), 60.0, 61.3, 61.6, 61.7 (24-C, 33-C), 63.9 (br, 18-C), 73.4, 74.0, 78.3, 78.5, 80.4, 80.7, (34-C, 52-C, 56-C), 110.3, 110.4 (12-C), 111.2, 111.4 (8-C), 118.3, 118.5, (15-C), 119.7, 119.8 (14-C), 122.4, 122.4 (13-C), 122.9 (9-C), 124.1, 124.4 (50-C), 126.8 (16-C), 129.5, 129.6, (49-C), 126.9, 127.2, 127.7, 127.8, 127.8, 127.9, 128.0, 128.4, 128.7, 129.3, 129.8, 129.9, 130.0, 130.2, 131.5 (27-C, 28-C, 41-C, 42-C, 43-C), 129.7, 129.8 (48-C), 132.8, 133.0, 133.1, 133.2 (25-C), 135.7, 135.7, 135.8, (26-C), 135.9, 136.1, 136.2, 136.3 (40-C, 11-C), 151.6, 154.2, 154.7, 155.6 (51-C, 55-C), 169.3, 169.4, 169.9, 169.9, 170.6, 171.0, 171.1, 171.7, 171.8, 172.6 (2-C, 5-C, 17-C, 31-C, 37-C, 45-C). **IR (KBr)**: 1679 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 1263 (100) [M+H]⁺, 1280 (92) [M+NH₄]⁺, 1285 (44) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 1263.6888, berechnet für C₇₁H₉₅N₈O₁₁Si⁺: 1263.6884; m/z = 1285.6696, berechnet für C₇₁H₉₄N₈NaO₁₁Si⁺: 1285.6704. **R_f**: 0.18 (EE).

3.34 ((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-((2S,5S)-4-((S)-1-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)-5-(hydroxymethyl)-2-isopropyl-3-oxopiperazin-1-yl)-3-(tert-butoxy)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-3-(4-(tert-butoxy)phenyl)-1-oxopropan-2-yl)carbamidsäure-tert-Butylester (142, TZD-233)



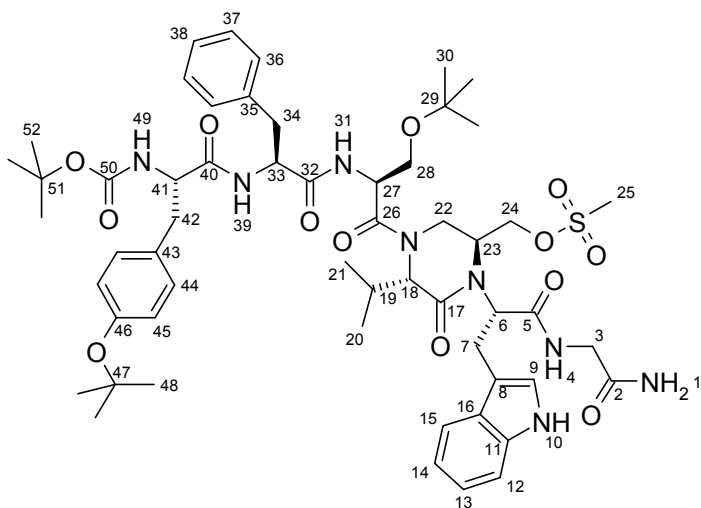
Der Silylether **141** (667 mg, 528 μmol) wird in THF (20 mL) gelöst und bei 0 °C mit einer 1 M Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in THF (1.06 mL, 1.06 mmol) versetzt. Nach Rühren für 19 h wird gesättigte Natriumchloridlösung (20 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und anschließend die wässrige Phase mit Dichlormethan (4x 30 mL) extrahiert. Die THF-Phase wird mit den Dichlormethanphasen vereinigt. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (EE/EtOH, 9:1) liefert das Peptid **142** (438 mg, 427 μmol , 81 %) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, MeCN)⁵: δ = 0.66 (d, J = 7.0 Hz, 1.8H, 20-H), 0.74 (d, J = 7.0 Hz, 1.8H, 21-H), 0.86 (m, 2.4H, 20-H, 21-H), 1.13, 1.13 (jeweils s, 9H, 52-H), 1.30-1.34 (m, 18H, 30-H, 48-H), 1.98 (m, 1H, 19-H), 2.68 (m, 1H, 42-H), 2.78 (dd, J = 3.6 Hz, J = 14.0 Hz, 0.4H, 22H), 2.84-3.12 (m, 4.4H, 22-H, 24-H, 34-H, 42-H), 3.21-3.29 (m, 1H, 24-H, 28-H), 3.32-3.47 (m, 3.2H, 7-H, 24-H, 28-H), 3.59 (m, 0.6H, 23-H), 3.64-3.73 (m, 2.4H, 3-H, 23-H, 28-H), 3.86 (m, 0.4H, 3-H), 3.90 (dd, J = 6.2 Hz, J = 16.9 Hz, 0.6H, 3-H), 4.03 (dd, J = 5.1 Hz, J = 6.8 Hz, 0.6H, 25-H), 4.13-4.23 (m, 2H, 22-H, 25-H, 41-H), 4.51-4.59 (m, 1.4H, 22-H, 33-H), 4.62 (m, 0.4H, 18-H), 4.64 (d, J = 5.1 Hz, 0.6H, 18-H), 4.67 (ψ dd, J = 7.4 Hz, J = 13.6 Hz, 0.4H, 27-H), 4.96 (ψ dd, J = 7.4 Hz, J = 15.1 Hz, 0.6H, 27-H), 5.20 (dd, J = 6.5 Hz, J = 9.9 Hz, 0.6H, 6-H), 5.31 (dd, J = 6.3 Hz, J = 10.3 Hz, 0.4H, 6-H), 5.46 (d, J = 6.1 Hz, 0.6H, 49-H), 5.66 (d, J = 7.2 Hz, 0.4H, 49-H), 5.88 (s, 0.6H, 1-H), 6.13 (s, 0.4H, 1-H), 6.58 (s, 0.6H, 1-H), 6.67 (s, 0.4H, 1-H), 6.88-6.93 (m, 2.6H, 45-H, 39-H), 7.00-7.12 (m, 5.4H, 9-H, 14-H, 31-H, 39-H, 44-H), 7.13-7.32 (m, 7H, 4-H, 13-H, 35-H, 36-H, 37-H), 7.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 12-H), 7.61 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 15-H), 9.22 (s, 0.6H, 10-H), 9.25 (s, 0.4H, 10-H). ¹³C-NMR (100 MHz, MeCN): δ = 19.9, 20.0, 20.1, 20.8, (20-C, 21-C), 23.8 (7-C), 27.6, 27.6, 28.5, 29.1 (30-C, 48-C, 52-C), 33.6, 33.9 (19-C), 37.8 (42-C), 38.5, 38.6 (34-C), 40.4, 44.7 (22-C), 43.1, 43.4 (3-C), 49.2, 50.4 (27-C), 54.7, 54.9 (33-C), 55.2, 55.4 (23-C), 57.0, 57.3 (41-C), 58.4, 58.7 (6-C), 59.3, 61.1 (24-C), 60.5, 64.2 (18-C), 62.3, 62.5 (28-C), 74.1, 74.7, 78.9, 80.2, 80.5 (29-C, 47-C, 51-C), 111.2, 111.3 (8-C), 112.4, 112.4 (12-C), 119.3, 119.3 (15-C), 119.9, 120.0 (14-C), 122.6 (13-C), 124.1, 124.3 (9-C), 124.7, 124.8 (45-C), 127.7, 127.7, 129.4, 129.4, 130.3, 130.4 (36-C, 37-C, 38-C), 128.1, 128.2, 133.0, 133.1 (16-C, 43-C), 130.7 (44-C), 137.5, 137.6, 137.9 (11-C, 35-C), 155.2, 156.6 (50-C, 46-C), 170.0, 170.3, 171.1, 171.4, 171.6, 171.7, 172.0, 172.3, 172.6, 172.7 (2-C, 5-C, 17-C, 26-C, 32-C, 40-C). IR (KBr): 1653 (CO) cm^{-1} . HPLC-ESI-MS: m/z (%) = 1025 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1042 (11) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 1047 (51)

⁵ *cis/trans*-Isomerengemisch (6:4)

[M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 1025.5697, berechnet für C₅₅H₇₆N₈NaO₁₁⁺: 1025.5706; m/z = 1047.5519, berechnet für C₅₅H₇₆N₈NaO₁₁⁺: 1047.5526. **R_f**: 0.38 (EE/EtOH, 9:1).

3.35 ((2*S*,5*S*)-1-((*S*)-1-((2-Amino-2-oxoethyl)amino)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)-4-((6*S*,9*S*,12*S*)-9-benzyl-6-(4-*tert*-butoxy)benzyl)-12-(*tert*-butoxymethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oyl)-5-isopropyl-6-oxopiperazin-2-yl)methyl methanesulfonat (143, TZD-234)



Der Peptidalkohol **142** (272 mg, 265 μmol) wird in DCM (10 mL) vorgelegt und bei 0 °C mit TEA (110 μl, 794 μmol) und Mesylchlorid (40 μl, 518 μmol) versetzt. Nach Rühren für 30 min bei Raumtemperatur wird gesättigte Natriumhydrogencarbonat-lösung (10 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wird abgetrennt und anschließend mit Dichormethan (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Säulenchromatographischer Reinigung (DCM/MeOH, 20:1) liefert das Mesylat **143**

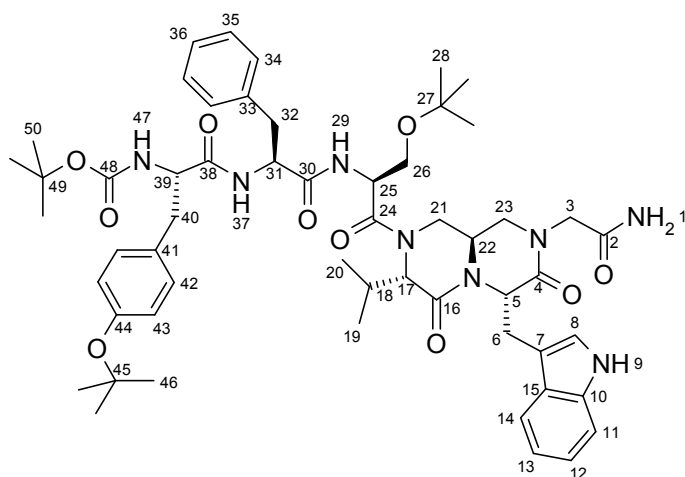
(247 mg, 224 μmol, 85 %) als farbloses Pulver.

¹H-NMR (400 MHz, MeCN)⁶: δ = 0.73-0.78 (m, 3H, 20-H, 21-H), 0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 1.5H, 20-H), 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 1.5H, 21-H), 1.12 (s, 4.5H, 30-H), 1.14 (s, 4.5H, 30-H), 1.31 (s, 4.5H, 48-H), 1.31 (s, 4.5H, 48-H), 1.32 (s, 4.5H, 52-H), 1.33 (s, 4.5H, 52-H), 1.95-2.10 (m, 1H, 18-H), 2.71 (m, 1H, 42-H), 2.84 (s, 1.5H, 25-H), 2.89-3.11 (m, 5H, 22-H, 25-H, 34-H, 42-H), 3.18 (m, 0.5H, 24-H), 3.30 (ψt, *J* = 6.8 Hz, 0.5H, 28-H), 3.33-3.59 (m, 3H, 7-H, 24-H, 28-H), 3.61-3.76 (m, 1.5H, 28-H, 24-H), 3.77-3.90 (m, 3.5 H, 3-H, 23-H, 24-H), 3.99-4.23 (m, 2H, 22-H, 24-H, 41-H), 4.54-4.66 (m, 2H, 18-H, 22-H, 33-H), 4.70 (ψq, *J* = 7.0 Hz, 0.5H, 27-H), 4.74 (d, *J* = 5.8 Hz, 0.5H, 18-H), 4.81 (ψq, *J* = 7.5 Hz, 0.5H, 27-H), 5.03 (m, 1H, 6-H), 5.50 (d, *J* = 6.1 Hz, 0.5H, 49-H), 5.62 (d, *J* = 6.5 Hz, 0.5H, 49-H), 5.95 (s, 0.5H 1-H), 6.20 (s, 0.5H, 1-H), 6.52 (s, 0.5H, 1-H), 6.63 (s, 0.5H, 1-H), 6.89-6.95 (m, 2.5H, 45-H, 39H), 7.03-7.33 (m, 12.5H, 4-H, 9-H, 13-H, 14-H, 31-H, 36-H, 37-H, 38-H, 39-H, 45-H), 7.42 (m, 1H, 12-H), 7.62 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.5H, 15-H), 7.64 (d, *J* = 7.7 Hz, 0.5H, 15-H), 9.29 (s, 0.5H, 10-H), 9.49 (s, 0.5H, 10-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeCN): δ = 19.9, 19.9, 20.2, 20.8 (20-C, 21-C), 23.8, 23.9 (7-C), 27.4, 27.5, 28.3, 28.9, 28.9 (30-C, 48-C, 52-C), 33.4, 33.6 (19-C), 36.9, 37.5, 38.1, 38.3, 38.4, 42.6 (22-C, 25-C, 34-C, 42-C), 43.1, 43.4 (3-C), 49.2, 50.2 (26-C), 54.0, 54.7 (23-C), 54.8 (33-C), 57.1 (41-C), 59.8, 60.0 (6-C), 62.1, 62.4 (28-C), 60.3, 63.5 (18-C), 65.9, 67.6 (24-C), 74.0, 74.1, 78.7, 80.1, 80.3 (29-C, 47-C, 51-C), 110.8, 110.8 (8-C), 112.4, 112.5 (12), 119.2 (15), 119.9, 120.0 (14), 122.6, 122.6 (13), 124.3, 124.4 (9-C), 124.5, 124.6 (45-C), 127.8, 128.0 (16-C), 127.6, 129.3, 130.1, 130.2 (36-C, 37-C, 38-C), 130.6 (44-C), 132.7, 132.8 (43-C), 137.3, 137.4, 137.8, 137.9 (11-C, 35-C), 155.1, 156.5, 156.6 (46-C, 50-C), 169.7, 169.9, 170.4, 171.0, 171.4, 171.8, 171.8, 171.9, 172.1, 172.2, 172.4, 172.7 (2-C, 5-C, 17-C, 26-C, 32-C, 40-C). **IR (KBr)**: 1654 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 1103 (55) [M+H]⁺, 1120 (92) [M+NH₄]⁺, 1125 (100) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z

⁶ cis/trans-Isomerengemisch (1:1).

= 1103.5498, berechnet für $C_{56}H_{79}N_8O_{13}S^+$: 1103.5482; m/z = 1125.5231, berechnet für $C_{56}H_{78}N_8NaO_{13}S^+$: 1025.5301. **R_f**: 0.50 (EE/EtOH, 9:1).

3.36 tert-Butyl-(((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-((3S,6S,9aR)-6-((1H-Indol-3-yl)methyl)-8-(2-amino-2-oxoethyl)-3-isopropyl-4,7-dioxohexahydro-1H-pyrazino[1,2-a]pyrazin-2(6H)-yl)-3-(tert-butoxy)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-3-(4-(tert-butoxy)phenyl)-1-oxopropan-2-yl)carbamat (144, TZD-235)



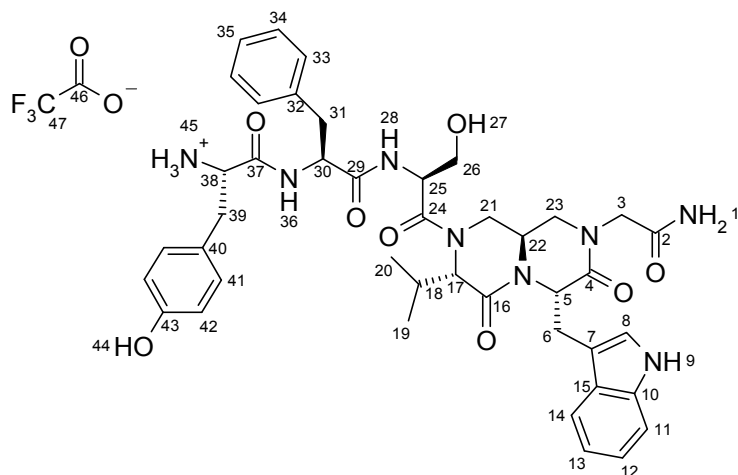
Das Mesylat **143** (49.9 mg, 45.2 μmol) wird in THF (4 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (4.7 mg, 196 μmol) versetzt. Anschließend wird der Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird gesättigte Natriumchloridlösung (10 mL) hinzugegeben und der Ansatz mit Essigester (3x 10 mL) extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat, Einengen und säulenchromatographischer Reinigung werden wird das bicyclische Produkt **144** (44.7 mg, 44.3 μmol , 97 %) als farbloses Pulver erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeCN):⁷ δ = 0.62 (d, J = 6.8 Hz, 1.5H, 19-H), 0.70 (d, J = 6.6 Hz, 1.5H, 20-H), 0.75 (d, J = 6.6 Hz, 1.5H, 19-H), 0.82 (d, J = 6.9 Hz, 1.5H, 20-H), 1.12 (s, 4.5H, 28-H), 1.13 (s, 4.5H, 28-H), 1.32 (s, 9H, 46-H), 1.33 (s, br, 9H, 50-H), 1.63 (m, 0.5H, 18-H), 1.80 (m, 0.5H, 18-H), 2.67 (m, 1H, 40-H), 2.82-3.03 (m, 4H, 21-H, 23-H, 32-H, 40-H), 3.16-3.27 (m, 1H, 21-H, 23-H), 3.29-3.44 (m, 3.5H, 6-H, 26-H, 23-H), 3.59 (dd, J = 11.1 Hz, J = 11.1 Hz, 0.5 H, 23-H), 3.63-3.76 (m, 2H, 22-H, 26-H), 3.81 (m, 1H, 3-H), 3.90 (ψd, J = 14.9 Hz, 0.5H, 22-H), 4.01 (m, 1H, 3-H), 4.19-4.22 (m, 1.5H, 17-H, 39-H), 4.36-4.43 (m, 1H, 21-H, 17-H), 4.51-4.58 (m, 1H, 31-H), 4.62 (ψq, J = 6.6 Hz, 0.5H, 25-H), 4.72 (m, 0.5H, 25-H), 5.27 (m, 1H, 5-H), 5.47 (d, J = 5.5 Hz, 0.5H, 47-H), 5.54 (d, J = 7.5 Hz, 0.5H, 47-H), 5.87 (s, 0.5H, 1-H), 6.19 (s, 0.5H, 1-H), 6.27 (s, 1H, 1-H), 6.88-6.93 (m, 2.5H, 43-H, 37-H), 7.00 (d, J = 6.7 Hz, 0.5H, 29-H), 7.05-7.29 (m, 11H, 8-H, 12-H, 13-H, 29-H, 34-H, 35-H, 36-H, 37-H, 42-H), 7.40 (ψt, J = 7.7 Hz, 1H, 11-H), 7.60 (ψt, J = 7.0 Hz, 1H, 14-H), 9.21 (s, 0.5H, 9-H), 9.23 (s, 0.5H, 9-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeCN): δ = 19.9, 20.0, 20.2, 20.6 (19-C, 20-C), 27.0, 27.1 (6-C), 27.6, 27.7 (28-C), 28.5, 29.1 (46-C, 50-C), 30.9, 31.2 (18-C), 36.8, 40.9 (21-C), 37.8, 38.0, 38.4, 38.5 (32-C, 40-C), 49.7, 49.7, 49.9, 50.4 (22-C, 25-C), 50.5, 50.7 (3-C), 51.9, 52.5 (23-C), 54.5, 54.9 (31-C), 56.2, 56.5 (5-C), 56.9 (39-C), 60.6, 64.7 (17-C), 62.4, 62.5 (26-C), 74.2, 74.2, 78.8, 78.9, 80.2 (27-C, 45-C, 49-C), 111.0, 111.2 (7-C), 112.3, 112.4 (11-C), 119.2 (14-C), 119.8, 119.9 (13-C), 122.4, 122.4 (12-C), 124.7, 124.7, 124.8, 124.9 (8-C, 43-C), 127.5, 127.7 (36-C), 128.9 (15-C), 129.3, 129.4, 130.3, 130.5 (34-C, 35-C), 130.7, 130.8 (42-C), 133.1, 133.2 (41-C), 137.1, 137.3, 137.9, 138.1 (10-C, 33-C), 155.1, 155.2, 156.5, 156.6 (44-C, 48-C), 155.9, 166.4, 168.8, 168.9, 169.8, 170.6, 170.9, 171.1, 171.5, 171.8, 172.3, 172.5 (2-C, 4-C, 16-C, 24-C, 30C, 38-C). **IR (KBr)**: 1648 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 907 (17) $[\text{M-Boc+H}]^+$, 1007 (53) $[\text{M+H}]^+$, 1024 (100)

⁷ cis/trans-Isomerengemisch (1:1).

$[M+NH_4]^+$, 1029 (45) $[M+Na]^+$. **HR-ESI-MS:** $m/z = 1029.5427$, berechnet für $C_{55}H_{74}N_8NaO_{10}^+$: 1029.5420. **R_f:** 0.33 (EE/EtOH, 9:1).

3.37 (S)-N-((S)-1-((3S,6S,9aR)-6-((1H-Indol-3-yl)methyl)-8-(2-amino-2-oxoethyl)-3-iso-propyl-4,7-dioxo-hexahydro-1H-pyrazino[1,2-a]pyrazin-2(6H)-yl)-3-hydroxy-1-oxopropan-2-yl)-2-((S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanamido)-3-phenyl-propanamid (145, TZD-240)



Das geschützte Peptid **144** (43.2 mg, 42.9 μmol) wird mit einer auf 0 °C gekühlten Lösung von TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt, eine H₂O/MeCN (4:1, 5 mL) zum Rückstand gegeben und die Lösung lyophilisiert. Es wird in quantitativer Ausbeute das Peptid **145** (39.0 mg,

42.9 μmol) als TFA-Salz erhalten.

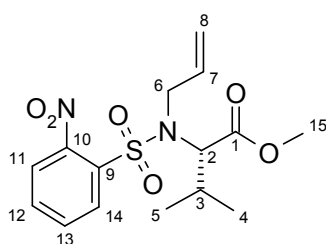
¹H-NMR (600 MHz, DMSO)⁸: $\delta = 0.53$ (d, $J = 6.7$ Hz, 1.8H, 19-C), 0.55 (d, $J = 6.6$ Hz, 1.8H, 20-H), 0.60 (d, $J = 6.6$ Hz, 1.2 H, 19-H), 0.74 (d, $J = 6.7$ Hz, 1.2H, 20-H), 1.45 (m, 0.6H, 18-H), 1.60 (m, 0.4H, 18-H), 2.65 (dd, $J = 10.8$ Hz, $J = 13.9$ Hz, 0.4H, 31-C), 2.71-2.78 (m, 2H, 31-H, 39-C), 2.91 (dd, $J = 4.9$ Hz, $J = 13.7$ Hz, 0.6H, 31-H), 2.98 (dd, $J = 4.9$ Hz, $J = 14.2$ Hz, 0.4 H, 21-H), 3.02 (m, 1H, 31-H), 3.15 (dd, $J = 4.6$ Hz, $J = 15.0$ Hz, 0.6H, 21-H), 3.12 (dd, $J = 3.6$ Hz, $J = 11.8$ Hz, 0.4H, 23-H), 3.24-3.45 (m, 4.4H, 6-H, 23-H, 26-H), 3.50 (d, $J = 16.5$ Hz, 0.4 H, 3-H), 3.53 (ψ t, $J = 11.5$ Hz, 0.6H, 23-H), 3.72 (m, 1H, 26-H), 3.81-3.97 (m, 3.8H, 3-H, 17-H, 21-H, 22-H, 38-H), 4.00 (m, 0.4H, 22-H), 4.13 (d, $J = 16.4$ Hz, 0.4H, 3-H), 4.29 (d, $J = 9.3$ Hz, 0.6H, 17-H), 4.38 (d, $J = 14.4$ Hz, 0.4H, 21-H), 4.52 (ddd, $J = 3.5$ Hz, $J = 8.5$ Hz, $J = 11.5$ Hz, 0.4 H, 30-H), 4.65 (m, 1.6 Hz, 25-H, 30-H), 4.83 (dd, $J = 5.1$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 0.4 H, 27-H), 4.86 (dd, $J = 5.9$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 0.6H, 27-H), 5.05 (dd, $J = 5.2$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 0.4H, 5-H), 5.13 (dd, $J = 5.2$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 0.6H, 5-H), 6.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 0.8 H, 41-H), 6.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 1.2H, 41-H), 6.96-7.07 (m, 4H, 12-H, 13-H, 42-H), 7.09 (s, 0.6H, 1-H), 7.12 (s, 0.4H, 1-H), 7.16-7.29 (m, 6H, 8-H, 33-H, 34-H, 35-H), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 0.8H, 11-H), 7.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 0.6H 11-H), 7.41 (s, 0.4H, 1-H), 7.43 (s, 0.6H, 1-H), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 0.4H, 14-H), 7.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 0.6H, 14H), 7.89 (s, br, 3H, 45-H), 8.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 0.6H, 28-H), 8.71 (m, 1H, 28H, 36-H), 8.76 (d, $J = 8.1$ Hz, 0.4H, 36-H), 9.32 (s, 0.4H, 44-H), 9.36 (s, 0.6H, 44-H), 10.83 (s, 0.4H, 9-H), 10.87 (s, 0.6H, 9-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, DMSO): $\delta = 19.2$, 19.3, 19.5, 19.5 (19-C, 20-C), 25.7, 25.8 (6-C), 29.3, 29.5 (18-C), 35.3 (21-C), 36.2, 37.6, 37.6 (31-C, 39-C), 38.4 (21-C), 47.8, 47.9 (22-C), 49.0, 49.2 (3-C), 49.8, 50.1 (25-C), 50.8, 51.0 (23-C), 53.3, 53.3 (38-C), 53.8, 54.0 (30-C), 54.8, 54.9 (5-C), 59.0 (18-C), 61.0 (26-C), 63.0 (17-C), 109.2 (7-C), 111.3 (11-C), 115.3 (42-C), 117.8 (14-C), 118.1 (13-C), 120.7 (12-C), 124.0 (8-C), 124.5 (47-C), 127.6 (15-C), 126.4, 128.0, 128.1, 129.1 (33-C, 34-C, 35-C), 130.5 (41-C), 130.6 (40-C), 135.9, 137.1, (10-C, 32-C), 156.6, 157.6,

⁸ *cis/trans* Isomerengemisch (6:4).

(43-C), 157.8 (46-C), 164.1, 164.8, 167.0, 168.0, 168.0, 169.1, 169.3, 170.5, 170.8 (2-C, 4-C, 16-C, 24-C, 29-C, 37-C). **IR (KBr):** 1642, 1673 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 795 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 817 (26) $[\text{M}+\text{Na}]$. **HR-ESI-MS:** m/z = 795.3822, berechnet für $\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_8^+$: 795.3824; m/z = 817.3644, berechnet für $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{NaO}_8^+$: 817.3644. **R_f:** 0.15 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 7:3).

4. Verbindungen aus Kapitel 4.2.2

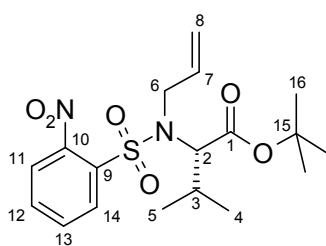
4.1 (S)-3-Methyl-2-(N-allyl-2-nitrophenylsulfonamido)butansäuremethylester (147, TZD-111)



Das Sulfonamid **96a** (8.33 g, 26.3 mmol) wird in DMF (400 mL) vorgelegt und mit Cäsiumcarbonat (13.2 g, 40.6 mmol) versetzt. Nach 30 Minuten wird Allylbromid (4.5 mL, 52.1 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird DMF am Rotationsverdampfer entfernt und der ölig braune Rückstand in Wasser (200 mL) aufgenommen. Die wässrige Lösung wird mit DCM (4x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Allylsulfonamid **147** (9.07 g, 25.4 mmol, 97 %) wird als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.86, 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 6H, 4-H, 5-H), 2.15 (m, 1H, 2-H), 3.43 (s, 3H, 15-H), 4.03 (d, J = 6.5 Hz, 1H, 2-H), 4.09 (d, J = 10.2 Hz, 2H, 6-H), 5.04 (d, J = 10.2 Hz, 1H, 8-H), 5.12 (dd, J = 1.0 Hz, J = 17.3 Hz, 1 H, 8-H) 5.74-5.82 (m, 1H, 7-H), 7.50 (m, 1H, 14-H), 7.58-7.66 (m, 2H, 12-H, 13-H) 7.90 (m, 1H, 11-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl_3): δ = 19.2 (4-C, 5-C), 28.1 (3-C), 48.2 (6-C), 51.4 (15-C), 65.5 (2-C), 117.7 (8-C), 123.6 (14-C), 128.9 (11-C), 131.2 (12-C), 132.7 (9-C), 133.6 (13-C), 134.5 (7-C), 147.9 (2-C), 170.2 (1-C). **IR:** 1737 (C=O), 1541 (N=O) cm^{-1} . **HLPC-ESI-MS:** m/z (%) = 297 (100) $[\text{M}-\text{CO}_2\text{CH}_3]^+$, 357 (96) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 374 (82) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. **HR-ESI-MS:** gefunden: 379.0929, berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}^+$: 379.0934. **R_f-Wert:** 0.52 (DCM).

4.2 (S)-3-Methyl-2-(N-Allyl-2-nitrophenylsulfonamido)butansäure-tert-butylester (149, TZD-137)

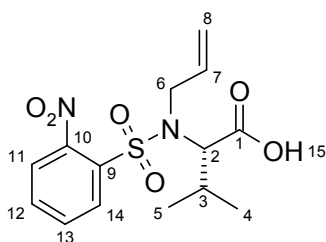


Das Sulfonamid **96b** (1.44 g, 4.02 mmol) wird in DMF (50 mL) gelöst und mit Cäsiumcarbonat (2.31 g, 7.07 mmol) versetzt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird Allylbromid (690 μl , 7.99 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 16 h gerührt. Anschließend wird Wasser (50 mL) hinzugefügt und das Gemisch mit Dichlormethan (4x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösung eingeeengt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Sulfonamid **149** (1.59 g, 3.99 mmol, 99 %) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 4-H), 1.01 (d, J = 6.7 Hz, 3H, 5-H), 1.30 (s, 9H, 16-H), 2.21 (m, 1H, 3-H), 4.08 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 2-H), 4.15 (m, 2H, 6-H), 5.07 (dd, J = 10.1 Hz, J = 1.1 Hz, 1H, 8-H), 5.21 (dd, J = 17.2 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, 8-H), 5.91 (m, 1H, 7-H), 7.57 (m, 1H, 14-H), 7.64 (m, 2H, 12-H, 13-H), 8.02 (m, 1H, 11-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl_3): δ = 19.4, 19.7 (4-C, 5-C), 27.8 (16-C), 28.8 (3-C), 48.5 (6-C), 66.7 (2-C), 82.0 (15-C), 117.8 (8-C), 124.0 (14-C), 131.3, 131.4, 133.4 (11-C, 12-C, 13-C), 133.9 (9-C), 135.4 (7-C), 148.4 (10-C), 169.3 (1-C). **IR (KBr):** 1730 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** 257 (68) $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{C}_4\text{H}_9-$

$C_3H_5+H]^+$, 297 (41) $[M-CO_2-C_4H_9]^+$, 343 (100) $[M-C_4H_8+H]^+$, 416 (92), $[M+NH_4]^+$, 814 (8) $[2M+NH_4]^+$. **HR-ESI-MS:** gefunden: 416.1851, berechnet für $C_{18}H_{30}N_3O_6S^+$: 416.1850. **R_f:** 0.4 (CH/EE, 2:1).

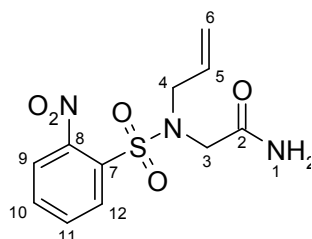
4.3 (S)-3-Methyl-2-(N-Allyl-2-nitrophenylsulfonamido)butansäure (148, TZD-121)



Der Aminosäureester **149** (4.79 g, 12.0 mmol) wird in Dichlormethan (30 mL) gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit TFA (15 mL, 194 mmol) versetzt. Nach Rühren für 5 h wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE + 0.1 % HOAc) gereinigt. Die Aminosäure **148** (4.11 g, 12.0 mmol) wird in quantitativer Ausbeute als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.99, (d, *J* = 6.7 Hz, 6-H, 4-H), 1.03 (d, *J* = 6.7 Hz, 6-H, 5-H), 2.23 (m, 1 H, 3-H), 4.09 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 5-H), 4.11 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 6-H), 4.26 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 2-H), 5.09 (dd, *J* = 10.2 Hz, *J* = 0.8 Hz, 1H, 8-H), 5.12 (dd, *J* = 17.2 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1 H, 8-H), 5.89 (m, 1H, 7-H), 7.60 (m, 1H, 14-H), 7.67 (m, 2H, 12-H, 13-H), 8.04 (m, 1H, 11-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 19.6, 19.7 (4-C, 5-C), 28.5 (3-C), 48.9 (6-C), 65.7 (7-C), 118.3 (8-C), 124.1 (14-C), 131.4, 131.5 (11-C, 12-C), 133.2 (9-C), 133.8 (13-C), 134.6 (7-C), 148.1 (10-C), 175.2 (1-C). **IR:** 3450 (OH), 1715 (C=O), 1547 (N=O) cm⁻¹. **HLPC-ESI-MS:** m/z (%) = 257 (42), 297 (24) $[M-CO_2H]^+$, 343 (70) $[M+H]^+$, 360 (100) $[M+NH_4]^+$. **HR-ESI-MS:** gefunden: 365.0777, berechnet für $C_{14}H_{18}N_2NaO_6S^+$: 365.0778. **R_f:** 0.15 (EE - 0.1% AcOH).

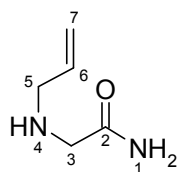
4.4 (N-Allyl-2-nitrophenylsulfonylamido)acetamid (150, TZD-119)



Das Sulfonamid **96e** (7.97 g, 30.8 mmol) wird in DMF (150 mL) gelöst und mit Cäsiumcarbonat (15.1 g, 46.0 mmol) versetzt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird Allylbromid (5 mL, 57.9 mmol) hinzugegeben und der Ansatz für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird einer Soxhlet-Extraktion mit DCM unterworfen. Das Extrakt wird eingeeengt und säulenchromatographisch gereinigt (EE). Das Allylsulfonamid **150** (4.95 g, 16.6 mmol, 54 %) wird als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ = δ = 3.86 (s, 2H, 3-H), 3.93 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, 4-H), 5.13 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, 6-H), 5.15 (d, *J* = 17.6 Hz, 1 H, 6-H), 5.65 (m, 1H, 5-H), 7.02 (s, 1H, 1-H), 7.36 (s, 1H, 1-H), 7.78-7.84 (m, 2H, 10-H, 11-H), 7.90 (m, 1H, 12-H), 8.13 (m, 1H, 9-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₆-DMSO): δ = 47.8 (3-c), 50.5 (4-C), 119.3 (6-C), 124.0 (12-C), 130.2 (9-C), 132.2, 132.2, 132.2 (5-C, 7-C, 10-C), 134.3 (11-C), 147.4 (8-C), 168.8 (2-C). **IR:** 1650 (CO), 1380, 1164 (SO₂) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 300 (100) $[M+H]^+$, 317 (40) $[M+NH_4]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 322.0463 berechnet für $C_{11}H_{13}N_3NaO_5S^+$: 322.0468. **R_f-Wert:** 0.26 (EE).

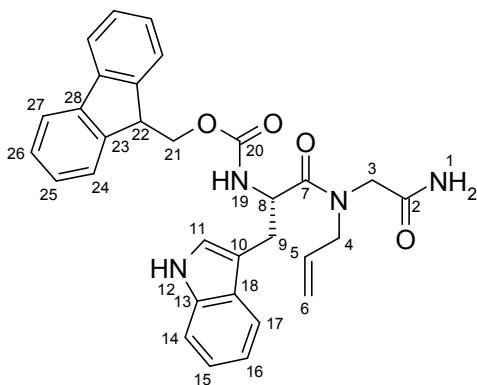
4.5 (2-Allylamino)acetamid (151, TZD-120)



Das Sulfonamid **150** (4.77 g, 15.9 mmol) wird in Acetonitril (150 mL) gelöst und mit Kaliumcarbonat (5.70 g, 41.2 mmol) und Thiophenol (2.5 mL, 24.5 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 24 Stunden wird Wasser (100 mL) zugegeben. Anschließend wird der pH-Wert mit Salzsäure (1 M) auf 3 eingestellt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit Essigester (4x 100 mL) extrahiert. Die vereinten Essigesterphasen werden mit Salzsäure (1M, 100 mL) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit Kaliumcarbonat neutralisiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wird das Rohprodukt einer Soxhlet-Extraktion mit Essigester (36 h) unterworfen. Nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung des Extrakts (EE/EtOH, 7:3) wird das Produkt **151** (1.63 g, 14.2 mmol, 89 %) als schwach gelber kristalliner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ = 2.66 (s, br, 1H, 4-H), 2.98 (s, 2H, α 3-H), 3.08 (d, 2H, J = 4.3 Hz, 5-H), 5.01 (d, 1H, J = 10.1 Hz, 7-H), 5.11 (d, 1H, J = 17.2 Hz, 7-H), 5.78 (m, 1H, 6-H), 6.95 (s, 1H, 1-H), 7.20 (s, 1H, 1-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₆-DMSO): δ = 51.1 (3-C), 51.5 (5-C), 115.6 (7-C), 137.2 (6-C), 173.6 (1-C). **IR**: 3380 (NH), 1670 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 115 [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: gefunden: 115.0866, berechnet für C₅H₁₁N₂O⁺: 115.0866. **R_F-Wert**: 0.18 (EE-EtOH, 7:3).

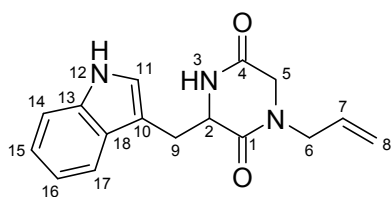
4.6 (S)-(1-(Allyl(2-amino-2-oxoethyl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)carbamidsäure-(9-fluorenyl)methylester (152, TZD-122)



N-Allyl-Glycinamid **151** (58.5 mg, 513 μ mol) wird in Acetonitril (30 mL) gelöst und dazu Fmoc-Trp (229 mg, 537 μ mol), HATU (221 mg, 580 μ mol) und DIPEA (190 μ l, 1.12 mmol) gegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 14 h wird gesättigte Natriumchloridlösung (50 mL) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (2x 30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE) gereinigt. Das Dipeptid **152** (183.3 mg, 351 μ mol, 68 %) wird als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ = 3.00–3.16 (m, 2H, 9-H), 3.70–4.38 (m, 7H, 3-H, 4-H, 21-H, 22-H), 4.49, 4.66 (m, 1H, 8-H), 5.00–5.12 (m, 2H, 6-H), 5.65 (m, 1H, 5-H), 6.95–7.86 (m, 16H, 1-H, 11-H, 14-H, 15-H, 16-H, 17-H, 24-H, 25-H, 26-H, 27-H, 19-H), 10.78, 10.81 (s, 12-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₆-DMSO): δ = 38.1, 38.2 (9-C), 46.6, 46.7 (22-C), 48.9, 49.0 (4-C), 51.2, 51.3 (3-C), 51.6, 51.6 (8-C), 65.7, 65.9 (21-C), 109.4, 110.2 (10-C), 111.1, 111.3 (14-C), 116.8, 116.9 (6-C), 118.1, 118.2 (17-C), 118.3, 118.4 (16-C), 119.9 (24-C), 120.7, 120.8 (15-C), 123.8, 123.9 (11-C), 125.3 (25-C), 127.0 (27-C), 127.2, 127.3 (18-C), 127.5 (26-C), 133.3, 133.4 (5-C), 136.0 (13-C), 140.6 (23-C), 143.6, 143.7 (28-C), 155.8, 155.9 (20-C), 169.9, 170.1 (7-C), 172.1, 172.6 (2-C). **IR**: 3267 (NH), 1670 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 523 (100) [M+H]⁺, 540 (48) [M+NH₄]⁺. **HR-ESI-MS**: gefunden: 545.2160, berechnet für C₃₁H₃₀N₄NaO₄⁺: 545.2159. **R_F-Wert**: 0.64 (EE/EtOH, 8:2).

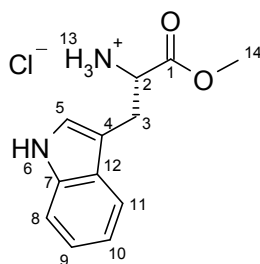
4.7 (S)-1-Allyl-3-(3'-indoylmethyl)-2,5-dioxopiperazin (154, TZD-123)



Das Fmoc-geschützte Dipeptid **152** (327 mg, 0.63 mmol) wird in DMF (25 mL) gelöst und mit Piperidin (625 μ l, 6.32 mmol) versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt anschließend durch Säulenchromatographie (EE-EE/EtOH, 8:2) gereinigt. Das Diketopiperazin **154** (146 mg, 0.52 mmol, 82 %) wird als farbloser Feststoff erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ = 2.56 (d, J = 17.1 Hz, 1H, 5-H) 2.99 (dd, J = 14.4 Hz, J = 4.2 Hz, 1H, 9-H), 3.26 (d, J = 17.0 Hz, 1H, 5-H), 3.29 (dd, J = 14.0 Hz, J = 4.2 Hz, 1H, 9-H), 3.55 (dd, J = 14.9 Hz, J = 6.5 Hz, 1H, 6-H), 3.63 (dd, J = 14.9 Hz, J = 5.4 Hz, 1H, 6-H), 4.14 (ψ s, 1H, 2-H), 4.88 (m, 2H, 8-H), 5.13 (m, 1H, 7-H), 6.94 (m, 1H, 16-H), 7.03 (m, 2H, 11-H, 15-H), 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 1H, 14-H), 7.47 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 17-H), 8.21 (s, 1H, 3-H), 10.89 (s, 1H, 12-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₆-DMSO): δ = 29.8 (9-C), 47.3 (6-C), 48.2 (5-C), 55.7 (2-C), 107.9 (10-C), 111.2 (14-C), 117.9 (8-C), 118.4 (16-C), 118.7(17-C), 121.0 (15-C), 124.8 (11-C), 127.4 (18-C), 131.7 (7-C), 136.0 (13-C), 165.1, 165.8 (1-C, 4-C). **IR**: 3255 (NH), 1663 (br, CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: 284 (100) [M+H]⁺, 567 (58) [2M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: gefunden: 284.1397., berechnet für C₁₆H₁₈N₃O₂⁺: 284.1394. **R_f-Wert**: 0.64 (EE/EtOH, 8:2).

4.8 (S)-2-Amino-3-(1H-indol-3-yl)propansäuremethylester-Hydrochlorid (156, TZD-134)



L-Tryptophan (25.0 g, 122 mmol) wird in trockenem Methanol (260 mL) suspendiert. Bei 0 °C wird frisch destilliertes Thionylchlorid (44.5 mL, 612 mmol) langsam zugetropft. Nach Auftauen auf Raumtemperatur und Rühren für 24 h wird Methanol und überschüssiges Thionylchlorid unter vermindertem Druck entfernt. Es wird Methanol (40 mL) und Diethylether(200 mL) hinzugegeben und der entstandene Feststoff filtriert. Das Filtrat wird einrotiert und erneut mit Diethylether versetzt. Der ausgefallene Feststoff wird erneut abgesaugt. Nach mehrmaligem

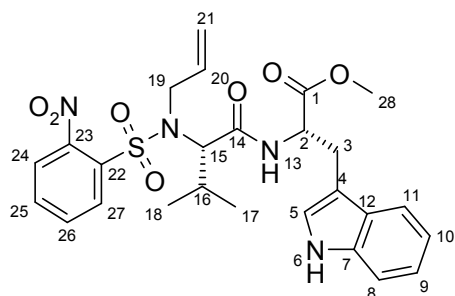
Waschen mit Diethylether (200 ml) wird L-Tryptophanmethylester-Hydrochlorid (28.6 g, 112 mmol, 92 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 3.23-3.35 (m, 2H, 3-H)⁹, 3.60 (s, 3H, 14-H), 4.15 (ψ t, J = 6.1 Hz, 1H, 2-H), 6.97 (ψ t, J = 7.3 Hz, 1H, 10-H), 7.05 (ψ t, J = 7.3 Hz, 1H, 9-H), 7.22 (s, 1H, 5-H), 7.34 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 8-H), 7.49 (d, J = 7.7 Hz, 1H, 11-H), 8.67 (s, 3H, 13-H), 11.09 (s, 1H, 6-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO): δ = 26.0 (3-C), 52.5, 52.6 (2-C, 14-C), 106.3 (4-C), 111.4 (8-C), 117.9 (11-C), 118.5(10-C), 121.0 (9-C), 124.8 (5-C), 126.8 (12-C), 136.1 (7-C), 169.6 (1-C). **IR (KBr)**: 3273 (NH), 1749 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 202 (20) [M-CH₂+H]⁺, 219 (100) [M+H]⁺, 437 (23) [2M+H]⁺. **R_f**: 0.36 (EE/EtOH, 8:2). **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20}$ = +17.4 (c = 2.9, MeOH); Literaturwert^[329]: $[\alpha]_D^{20}$ = +18 \pm 1 (c = 3, MeOH). Bestimmung des Enantiomerenüberschusses:¹⁰ R_i: 32.9 (S-Enantiomer), 29.9 (R-Enantiomer) (MZ Kromasil RP 18, λ = 350 nm, MeCN/0.1 % TFA 50:50, 0.6 mL \rightarrow MeCN/0.1 % TFA 80:20 in 60 min).

⁹ Überlagert durch Wassersignal, Wasser in DMSO 3.33 ppm.

¹⁰ Derivatisierung mit DNFB-iso-MI nach Kotthaus^[234]

4.9 (S)-2((S)-2(Allyl-(2-nitrophenylsulfonyl)-amino)-3-methyl-butrylamino)-3-(1H-indol-3-yl)-propionsäuremethylester (158, TZD-124)



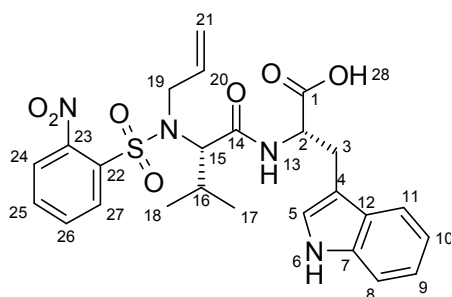
Die Nosyl-geschützte Aminosäure **148** (1.05 g, 3.06 mmol) wird in trockenem Acetonitril (100 mL) gelöst. Dazu wird L-Tryptophanmethylester-Hydrochlorid (893 mg, 3.51 mmol), PyBOP (1.98 g, 3.80 mmol) und DIPEA (1.6 mL, 9.16 mmol) gegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 16 h wird gesättigte Natriumchloridlösung (100 mL) hinzugegeben und die Mischung mit Ethylacetat (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Salzsäure (1 M, 2x 100 mL), gesättigter

Natriumhydrogencarbonatlösung (100 mL) und anschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (CH/EE, 7:3) liefert das Dipeptid **158** (1.28 g, 2.35 mmol, 77 %) als gelben Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 0.81 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 17-H), 0.88 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 18-H), 2.10 (m, 1H, 16-H), 2.93 (dd, J = 14.7 Hz, J = 7.9 Hz, 1H, 3-H), 3.05 (dd, J = 14.7 Hz, J = 6.3 Hz, 1H, 3-H), 3.49 (s, 3H, 28-H), 3.95 (ψ dd, J = 16.4 Hz, J = 4.6 Hz, 1H, 19-H), 4.09 (d, J = 10.6 Hz, 1H, 15-H), 4.32 (m, 2H, 19-H, 3-H), 4.91 (d, J = 10.2 Hz, 1H, 21-H), 5.08 (d, J = 16.7 Hz, 1H, 21-H), 5.70 (m, 1H, 20-H), 7.01 (ψ t, J = 7.40 Hz, 1H, 10-H), 7.08 (ψ t, J = 7.07 Hz, 1H, 9-H), 7.12 (d, J = 2.2 Hz, 1H, 5-H), 7.21 (ddd, J = 7.8 Hz, J = 7.9 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, 26-H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 8-H), 7.43 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 11-H), 7.60 (ddd, J = 7.8 Hz, J = 7.8 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, 25-H), 7.74 (dd, J = 7.9 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, 27-H), 7.81 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, 24-H), 8.64 (d, J = 6.5 Hz, 1H, 13-H), 10.82 (s, 1H, 6-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO): δ = 18.6 (17-C), 19.3 (18-C), 26.8 (3-C), 27.9 (16-C), 47.2 (19-C), 51.5 (28-C), 53.1 (2-C), 64.5 (15-C), 108.9 (4-C), 111.5 (8-C), 117.2 (21-C), 117.8 (11-C), 118.4 (10-C), 120.0 (9-C), 123.7 (5-C), 123.9 (24-C), 126.8 (12-C), 129.2 (27-C), 131.6 (26-C), 132.1 (22-C), 134.0 (25-C), 135.4 (20-C), 136.1 (7-C), 147.6 (23-C), 169.5 (14-C), 171.7 (1-C). **IR (KBr)**: 3396 (NH), 1741 (CO), 1676 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 543 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: gefunden: 543.1912, berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}^+$: 543.1908; gefunden: 565.1725, berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{S}^+$: 565.1727. **R_f**: 0.35 (CH/EE, 1:1).

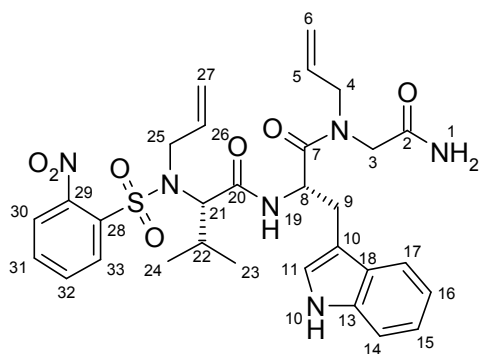
4.10 (S)-2((S)-2(Allyl-(2-nitrophenylsulfonyl)-amino)-3-methyl-butrylamino)-3-(1H-indol-3-yl)-propionsäure (159, TZD-130)

Der Carbonsäureester **158** (1.25 g, 2.31 mmol) wird in THF (20 mL) gelöst und mit Lithiumhydroxidmonohydrat (193.6 mg) gelöst in Wasser (10 mL) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 3 h wird Wasser (20 mL) hinzugegeben und die Lösung mit HCl (1 M) auf pH 4 angesäuert. Die wässrige Lösung wird mit EE (5x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE + 0.1 % HOAc) wird die Carbonsäure **159** (1.21 g, 2.30 mmol) in quantitativer Ausbeute als gelber Schaum erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 0.79 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 17-H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 18-H), 2.10 (m, 1H, 16-H), 2.92 (dd, J = 8.1 Hz, J = 14.8 Hz, 1H, 3-H), 3.06 (dd, J = 5.7 Hz, J = 14.8 Hz, 3-H), 3.30 (br, 1H, 28-H), 3.93 (dd, J = 4.3 Hz, J = 16.3 Hz, 1H, 19-H), 4.10 (d, J = 10.6 Hz, 1H, 15-H), 4.27-4.36 (m, 2H, 2-H, 19-H), 4.89 (d, J = 10.2 Hz, 1H, 21-H), 5.06 (d, J = 17.1 Hz, 1H, 21-H), 5.69 (m, 1H, 20-H), 7.00 (sept, J = 7.01 Hz, 1H, 10-H), 7.05-7.14 (m, 3H, 5-H, 9-H, 26-H), 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 1H, 8-H), 7.49 (d, J = 7.49 Hz, 1H, 11-H), 7.56 (ddd, J = 1.1 Hz, J = 7.9 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 25-H), 7.72 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, 27-H), 7.78 (dd, J = 1.1 Hz, J = 8.0 Hz, 1H, 24-H), 8.5 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 13-H) 10.78 (s, 1H, 6-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO): δ = 18.8 (17-C), 19.3 (18-C), 26.9 (3-C), 28.0 (16-C), 47.3 (19-C), 53.0 (2-C), 64.7 (15-C), 109.4 (4-C), 111.4 (8-C), 117.2 (21-C), 118.0 (11-C), 118.4 (10-C), 120.9 (9-C), 123.6 (5-C), 123.8 (24-C), 127.0 (12-C), 129.3 (27-C), 131.6 (26-C), 132.1 (22-C), 133.9 (25-C), 135.4 (20-C), 136.1 (7-C), 147.6 (23-C), 169.4 (14-C), 172.8 (1-C). **IR (KBr)**: 3415 (OH), 1734 (CO), 1670 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 529 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 551 (13) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: gefunden: 529.1753, berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}^+$: 529.1751; gefunden: 551.1565, berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{S}^+$: 551.1571. **R_f**: 0.27 (EE/EtOH, 8:2).

4.11 (S)-N-((S)-1-(Allyl-carbamoylmethyl-carbamoyl)-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl)-2-(allyl-(2-nitrophenylsulfonyl)-amino)-3-methyl-butansäureamid (160, TZD-137)

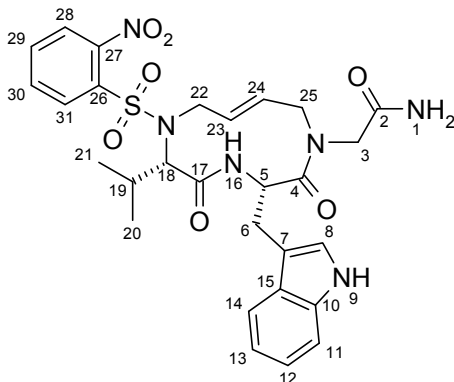


Die Carbonsäure **159** (460 mg, 870 μmol) wird in trockenem Acetonitril (10 mL) gelöst. Dazu wird BOP-Cl (251 mg, 968 μmol) und Allylglycinamids **151** (104 mg, 912 μmol) gegeben. Bei -10°C wird DIPEA (325 μl , 1.91 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch eine Minute bei dieser Temperatur gerührt. Nach weiteren 5 h Rühren bei Raumtemperatur wird Wasser (15 mL) hinzugegeben, die Phasen separiert und die wässrige Phase mit Ethylacetat (4x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (EE) liefert das Tripeptid **160** (371 mg, 594 μmol , 68 %) als gelber Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 0.76-0.85 (m, 6H, 23-H, 24-H), 2.06-2.14 (m, 1H, 22-H), 2.87-3.09 (m, 2H, 9-H), 3.43-4.40 (m, 7H, 3-H, 4-H, 5-H, 25-H), 4.61-4.79 (m, 1H, 21-H), 4.85-5.16 (m, 4H, 6-H, 27-H), 5.40-5.81 (m, 2H, 5-H, 26-H), 6.79-7.90 (m, 11H, 1-H, 11-H, 14-H, 15-H, 16-H, 17-H, 30-H, 31-H, 32-H, 33-H), 8.64, (d, J = 7.4 Hz, 0.5H, 19-H), 8.68 (d, J = 7.1 Hz, 0.5H, NH-19-H), 10.77 (s, 0.5H, 10-H), 10.84 (s, 0.5H, 10-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO): δ = 18.7, 18.8 (23-C), 19.2, 19.3 (24-C), 27.2, 27.6 (9-C), 28.0 28.1 (22-C), 47.1, 47.3, 48.2 48.8 (4-C, 25-C), 49.1, 49.2 (8-C), 50.8 (3-C), 64.4, 64.5 (21-C), 109.2, 109.6 (10-C), 111.4, 111.4 (8-C), 116.7, 116.7, 117.1, 117.2 (6-C, 27-C), 117.9, 118.2 (17-C), 118.4 (10-C), 120.9, 121.0 (15-C), 123.7, 123.8 (11-C), 123.9, 123.9 (30-C), 127.0, 127.1 (18-C), 129.4, 129.8 (33-C), 131.5, 131.7 (32-C), 131.9, 132.2 (28-C), 133.0, 133.1 (5-C), 133.9 134.1 (31-C), 135.3, 135.8 (26-C), 136.1 136.1 (13-C), 147.5, 147.6 (29-C), 169.3, 169.4, 169.7, 170.0, 171.5, 171.7 (2-C, 7-C, 20-C). **IR (KBr)**: 1654 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z

(%) = 625 (48) $[M+H]^+$, 642 (100) $[M+NH_4]^+$. **HR-ESI-MS:** gefunden: 647.2255, berechnet für $C_{30}H_{36}N_6NaO_7S^+$: 647.2258. **R_f:** 0.12 (EE).

4.12 2-((3*S*,6*S*,*E*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-6-isopropyl-7-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-2,5-dioxo-1,4,7-triazacycloundec-9-en-1-yl)acetamid (**165**, TZD-142)

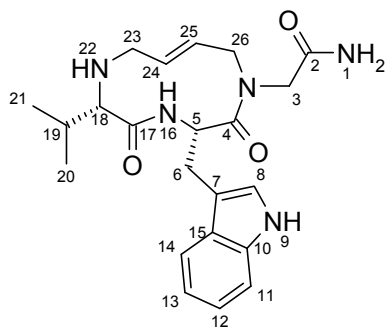


Das Tripeptid **160** (50.4 mg, 80.7 μ mol) wird in Dichlormethan (40 mL) gelöst, mit dem Zhan-Katalysator¹¹ (5.6 mg, 7.6 μ mol) versetzt und 48 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird Dichlormethan am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Kieselgelchromatographie (DCM/Aceton, 6:4) gereinigt. Der Macrocyclus **165** (32.1 mg, 53.8 μ mol, 67 %) wird als schwachgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeCN): δ = 0.84 (s, 3H, 20-H), 1.03 (s, 3H, 21-H), 2.36 (m, 1H, 19-H), 3.09 (m, 1H, 6-H), 3.34 (dd, J = 8.2

Hz, J = 13.5 Hz, 1H, 6-H), 3.53 (m, 1H, 25-H), 3.63 (m, 1H, 3-H), 3.82-4.19 (m, 4H, 3-H, 18-H, 22-H), 4.31 (ψ d, J = 14.9 Hz, 1H, 25-H), 4.71 (ψ s, 1H, 5-H), 5.42 (ψ t, J = 13.8 Hz, 1H, 24-H), 5.75 (m, 1H, 23-H), 6.07 (s, 1H, 1-H), 6.47 (s, 1H, 1-H), 7.06-7.17 (m, 4H, 8-H, 12-H, 13-H, 16-H), 7.39 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 11-H), 7.67-7.80 (m, 4H, 14-H, 29-H, 30-H, 31-H), 8.40 (ψ s, 1H, 28-H), 9.27 (s, 1H, 9-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeCN): δ = 19.9 (20-C), 21.5 (21-C), 25.4 (19-C), 28.1 (br, 6-C), 48.4, 53.3 (3-C, 5-C, 22-C, 25-C), 66.7 (18-C), 111.8 (7-C), 112.3 (11-C), 119.8, 119.9 (12-C, 14-C), 122.4 (13-C), 124.5, 124.5 (8-C, 28-C), 127.0 (24-C), 128.7 (15-C), 132.3 (31-C), 132.8, 132.8 (23-C, 29-C), 134.2 (30-C), 135.1 (26-C), 137.2 (10-C), 149.2 (27-C), 171.3, 172.2, 172.2 (2-C, 4-C, 17-C). **IR (KBr):** 1647 (CO), 1675 (CO) cm^{-1} . **(HPLC-ESI-MS:** 597 (28) $[M+H]^+$, 619 (100) $[M+Na]^+$. **HR-ESI-MS:** gefunden: 619.1944, berechnet für $C_{28}H_{32}N_6NaO_7S^+$: 619.1945. **R_f:** 0.35 (DCM/Aceton, 1:1).

4.13 2-((3*S*,6*S*,*E*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-isopropyl-2,5-dioxo-1,4,7-triazacycloundec-9-en-1-yl)acetamid (**166**, TZD-156)



Das Sulfonamid **165** (32.6 mg, 54.6 μ mol) wird in (DMF 1.5 mL) gelöst und mit LiOH (14.6 mg, 608 μ mol) und Mercaptoessigsäure (22 μ l, 331 μ mol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 2 h wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (5 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit Essigester (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Rohprodukt auf einer Kieselgelsäule (EE/EtOH, 1:1) gereinigt. Das Amin **166** (13.7 mg, 33 μ mol) wird in 61 % Ausbeute als schwach gelber Feststoff erhalten.

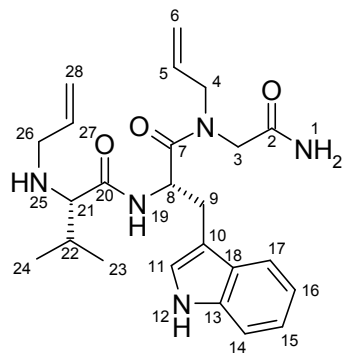
¹H-NMR (400 MHz, MeOH): δ = 0.79 (ψ dd, J = 6.8 Hz, J = 1.9 Hz, 6H, 20-H, 21-H), 1.64 (m, 1H, 19-H), 2.53 (d, J = 5.4 Hz, 1H, 18-H), 2.99 (ψ t, J = 12.0 Hz, 1H, 23-C), 3.32-3.51 (m, 3-H, 6-H, 26-H), 3.55 (ψ d, J = 11.5 Hz, 1H, 26-H), 3.81 (d, J = 18.8 Hz, 1H, 3-H), 4.15 (d, J = 18.8 Hz, 1H, 3-H), 4.47 (dd, J = 4.1 Hz, J = 10.9 Hz,

¹¹ Anstatt des Zhan Katalysators kann der Grell-Katalysator mit analoger Ausbeute verwendet werden.

1H, 5-H), 4.68 (ψ d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 26-H), 5.38 (ψ t, $J = 12.4$ Hz, 1H, 24-H), 5.64 (ψ dd, $J = 3.4$ Hz, $J = 15.9$ Hz, 1H, 25-H), 7.01 (ψ t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 13-H), 7.05 (s, 1H, 8-H), 7.09 (ψ t, $J = 7.0$ Hz, 1H, 12-H), 7.33 (d, 8.0 Hz, 1H, 11-H), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 14-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH): $\delta = 17.6, 18.0$ (20-C, 21-C), 25.9 (6-C), 31.0 (19-C), 49.5, 50.7, 51.0 (3-C, 23-C, 26-C), 54.0 (5-C), 66.2 (16-C), 110.8 (7-C), 111.2 (11-C), 118.1 (14-C, 12-C), 120.8 (13-C), 123.3 (8-C), 125.6 (24-C), 127.4 (15-C), 130.2 (25-C), 136.8 (10-C), 172.4, 173.3, 176.7 (2-C, 4-C, 17-C). **IR (KBr)**: 1712 (CO), 1637 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: 412 (54) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 434 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: gefunden: 434.2169, berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{NaO}_3^+$: 434.2163. **R_f**: 0.18 (EE/EtOH, 1:1).

4.14 (S)-N-((S)-1-(Allyl(2-amino-2-oxoethyl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)-2-(allylamino)-3-methylbutanamid (168, TZD-248)

Das Nosyl-Tripeptid **160** (245 mg, 392 μmol) wird in DMF (5 mL) gelöst und mit Mercaptoethanol (115 μL , 2.46 mmol) und Lithiumhydroxid (103 mg, 4.31 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird Wasser (20 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird mit EE (30 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/EtOH, 15:1) wird das entschützte Tripeptid **168** (167 mg, 379 μmol , 97 %) als farbloser Feststoff erhalten.

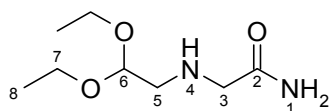


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.75$ (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, 23-C), 0.84 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, 24-H), 1.94 (m, 1H, 22-H), 2.87 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 21-H), 3.03-3.24 (m, 4H, 9-H, 4-H), 3.64 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H, 3-H), 3.72 (m, 1H, 26-H), 4.00 (m, 1H, 26-H), 4.09 (d $J = 16.5$ Hz, 1H, 3-H), 4.92-5.01 (m, 5H, 6-H, 8-H, 28-H), 5.45 (m, 1H, 27-H), 5.54 (s, 1H, 1-H), 5.77 (m, 2-H, 5-H, 25-H), 6.43 (s, 1H, 1-H), 7.03 (m, 2H, 11-H, 16-H), 7.11 (ψ t, $J = 7.6$ Hz, 1H, 15-H), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 14-H), 7.55 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 17-H), 7.73 (d, $J = 5.76$, 1H, 19-H), 8.77 (s, 1H, 12-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 17.5, 18.8$ (23-C, 24-C), 27.7 (9-C), 30.7 (22-C), 49.1, 49.2 (3-C, 8-C), 50.8, 51.1 (4-C, 26-C), 66.7 (21-C), 109.3 (10-C), 111.2 (14-C), 116.5, 117.4 (6-C, 28-C), 118.0 (17-C), 119.2 (16-C), 121.7 (15-C), 123.1 (11-C), 126.9 (18-C), 131.7, 135.2 (5-C, 27-C), 136.0 (13-C), 170.9, 172.8, 173.5 (2-C, 7-C, 20-C). **IR (KBr)**: 1683 (CO), 1636 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: 440 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 462 (10) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: gefunden: 462.2477, berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{NaO}_3^+$: 462.2476. **R_f**: 0.30 (EE/EtOH, 9:1).

5. Verbindungen aus Kapitel 4.2.3

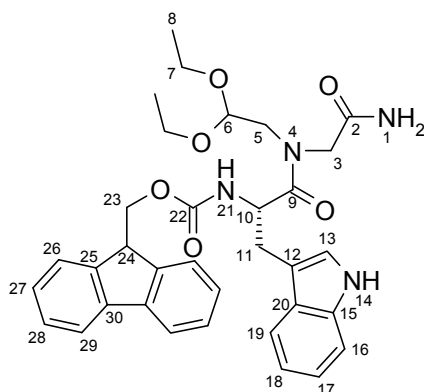
5.1 2-(2,2-Diethoxyethylamino)essigsäureamid (187, TZD-106)

Glycinamid-Hydrochlorid (5.04 g, 45.6 mmol) wird in trockenem Acetonitril (250 mL) gelöst und mit Natriumhydrogencarbonat (16.5 g, 121 mmol) versetzt. Anschließend wird 2-Bromacetaldehyddiethylacetal (6.8 mL 45.2 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 43 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Einengen der Lösung und Trocknen des Rohproduktes im Hochvakuum wird das Rohprodukt einer Soxhlet-Extraktion mit Essigester unterworfen. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Extrakts (EE/EtOH, 8:2) wird das Monoalkylierungsprodukt **187** (3.71 g, 19.5 mmol, 43 %) und das Dialkylierungsprodukt (483 mg, 1.57 mmol, 3.5 %) als schwach gelbes Öl erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1.09 (t, J = 7.1 Hz, 6H, 8-H), 2.52 (d, J = 5.5, 2H, 5-H), 3.03 (s, 2H, 3-H), 3.25 (s, br, 4-H), 3.39-3.47 (m, 2H, 7-H), 3.53-3.60 (m, 2H, 7-H), 4.46 (t, J = 5.4, 2H, 6-H) 6.94 (s, br, 1-H) 7.21 (s, br, 1-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₆-DMSO): δ = 15.26 (8-C), 51.51 (5-C), 51.78 (3-C), 61.25 (7-C), 101.65 (6-C), 173.32 (2-C). **IR(Film)**: 3325 (NH), 1678 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 145 (100) [M-OEt]⁺, 191 (32) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 213.1208, berechnet für C₈H₁₈N₂NaO₃⁺: 213.1210. **R_f**: 0.15 (EE/EtOH, 8:2).

5.2 (S)-1-((2-Amino-2-oxoethyl)(2,2-diethoxyethyl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-ylcarbamidsäurefluorenmethylester (188, TZD-107)

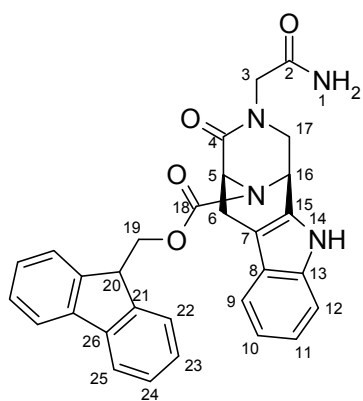


Das Amin **187** (865 mg, 4.55 mmol) wird in DCM (150 mL) gelöst und mit PyBOP (2.62 g, 5.00 mmol), DIPEA (1.55 mL, 9.09 mmol) und Fmoc-Trp-OH (1.98 g, 4.64 mmol) versetzt. Nach Rühren der Reaktion bei Raumtemperatur für 72 h wird die Mischung mit Salzsäure (2 M, 2x 25 mL) und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (25 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach chromatographischer Reinigung (EE) des Rohprodukts wird das Dipeptid **188** (1.93 g, 3.23 mmol, 71 %) als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 0.91-1.07 (m, 6H, 8-H), 2.98-3.58 (m, 8H, 5-H, 7-H, 11-H), 3.76-4.72, (m, 7H, 3-H, 10-H, 6-H, 23-H, 24-H), 6.91-7.85 (m, 16H, 13-H, 16-H, 17-H, 18-H, 21-H, 26-H, 27-H, 28-H, 29-H), 10.78, 10.85 (s, 1H, 14-H) **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO): δ = 14.0 (8-C), 27.1, 27.6 (11-C), 46.5, (24-C), 49.8, 50.4 (3-C), 51.1 (5-C) 51.2, 51.4 (10-C), 62.0, 62.5, 62.6, 62.8 (7-C), 65.8, 65.8 (23-C), 100.7, 101.6 (6-C), 109.8, 110.3, 111.1 111.4, 118.1, 118.3, 120.0, 120.7, 120.9, 123.9, 125.3, 127.0, 127.1, 127.3 127.5, 136.0, 136.1, 140.6, 143.6 (, 12-C, 13-C, 15-C, 16-C, 17-C, 18-C, 19-C, 20-C, 25-C, 26-C, 27-C, 28-C, 29-C, 30-C), 155.8, 155.9 (22-C), 167.5 (9-C) 170.1, 170.3 (2-C). **IR(KBr)**: 3322(NH), 1678 (CO), 1645 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: 507 (49), 553 (100) [M-OEt]⁺, 621 (63) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 621.2678 berechnet für C₃₄H₃₈N₄NaO₆⁺: 621.2684. **R_f-Wert**: 0.27 (EE).

5.3 (1S,5S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl 3-(2-amino-2-oxoethyl)-4-oxo-2,3,4,5,6,11-hexahydro-1H-1,5-epiminoazocino[4,5-b]indole-12-carboxylat (190, TZD-110)

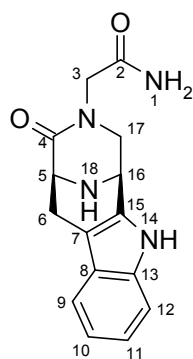
Das Acetal **188** (212 mg, 0.35 mmol) wird in Acetonitril/HCl (1 M, 25 mL, 2:1) gelöst und unter Eiskühlung für 3 h gerührt. Anschließend wird DCM (50 mL) und Wasser (30 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit DCM (2x, 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (30 mL) und gesättigter Natriumchloridlösung (30mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE) wird in 71 % Ausbeute das Cyclisierungsprodukt **190** (127.9 mg, 0.25 mmol) als gelber Feststoff erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 2.61-3.10 (m, 2H, 6-H), 3.33-3.50 (m, 2H, 3-H, 17-H), 3.94 (m, 1H, 17-H), 4.13 (m, 1H, 3-H), 4.27-4.85 (m, 4H, 5-H, 19-H, 20-H), 5.43 (m, 1H, 16-H), 6.94-7.90 (m, 14H, 1H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H, 22-H, 23-H, 24-H, 24-H), 10.93, 11.00 (s, 1H, 14-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO): δ = 24.7, 25.0 (6-C), 45.4, 46.3 (16-C), 46.5, 46.7 (20-C), 48.5 (3-C), 52.9, 53.1 (17-C), 53.3, 53.6 (5-C), 66.8, 67.1 (19-C), 106.3, 106.6 (7-C), 111.5, 117.8, 117.9, 118.4, 118.8, 120.1, 121.3, 121.4, 124.7, 124.8, 125.0, 127.0, 127.1, 127.6 (9-C, 10-C, 11-C, 12-C, 22-C, 23-C, 24-C, 25-C), 128.9, 131.5 (15-C), 140.7, 140.8, 143.6, 143.8 (21-C, 26-C), 125.9, 126.6 (8-C), 135.7, 135.8 (13-C), 153.1, 153.4

(18-C), 167.5, 167.8 (4-C), 169.2, 169.9 (2-C). **IR (KBr)**: 1683, 1639 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 507(90) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 524 (100) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 529.1806, berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{NaO}_4^+$: 529.1846. **R_f**: 0.5 (EE-EtOH, 8:2).

5.4 2-((1*S*,5*S*)-4-oxo-5,6-dihydro-1*H*-1,5-epiminoazocino[4,5-*b*]indol-3(2*H*,4*H*,11*H*))yl)acetamid (191, TZD-140)



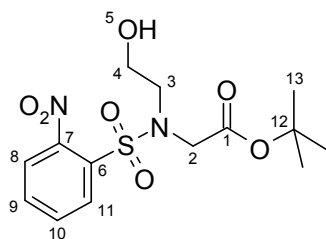
Das Acetal **188** (100.1 mg, 0.17 mmol) wird in Acetonitril/HCl (2 M, 25 mL, 2:1) gelöst unter Eiskühlung gerührt und für 3 h gerührt. Anschließend wird DCM (30 mL) und Wasser (30 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit DCM (2x, 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (30 mL) und gesättigter Natriumchloridlösung (30 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Abspaltung des Fmoc Schutzgruppe wird das Rohprodukt in DCM (10 mL) gelöst und mit Piperidin (170 μl , 1.69 mmol) versetzt. Nach Rühren über Nacht wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das entstandene Rohprodukt

mittels Säulenchromatographie (EE/EtOH, 8:2) gereinigt. Das Produkt **191** (25.1 mg, 88 μmol , 53 %) wird als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 2.74 (d, J = 15.3 Hz, 1H, 6-H), 2.89 (dd, J = 15.4 Hz, J = 5.8 Hz, 1H, 6-H), 3.23 (d, J = 11.3 Hz, 1H, 17-H), 3.30 (d, J = 16.2 Hz, 1H, 3-H), 3.81 (d, J = 5.3 Hz, 1H, 5-H), 3.91 (dd, J = 4.4 Hz, J = 11.4 Hz, 1H, 17-H), 4.09 (d, J = 16.4 Hz, 1H, 3-H), 4.25 (d, J = 4.1 Hz, 1H, 16-H), 6.85-6.95 (m, 3H, 1H, 10-H), 7.00 (q, J = 7.5 Hz, 1H, 11-H), 7.27 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 12-H), 7.33 (d, J = 7.76 Hz, 1H, 9-H), 10.79 (s, 1H, 14-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO): δ = 26.3 (6-C), 45.1 (16-C), 49.0 (3-C), 53.3 (5-C), 54.6 (17-C), 106.5 (7-C), 111.1 (12-C), 117.5 (9-C), 118.4 (10-C), 120.7 (11-C), 126.5 (8-C), 134.5 (15-C), 135.5 (13-C), 169.7, 170.9 (2-C, 4-C). **IR (KBr)**: 1627 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 285 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 569 (35) $[\text{2M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 307.1164, berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{NaO}_2^+$: 307.1165. **R_f**: 0.10 (EtOH).

5.5 2-(*N*-(2-Hydroxyethyl)-2-nitrophenylsulfonamido)essigsäure-*tert*-butylester (197, TZD-131)

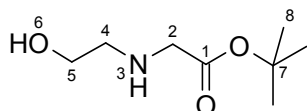
Das Sulfonamid **96d** (217.8 mg, 689 μmol) wird in DMF (10 mL) gelöst. Dazu wird DBU (225 μl , 70 mmol) und Bromethanol (90 μl , 1.27 mmol) hinzugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur gerührt. Nach 19 h wird erneut Bromethanol (90 μl , 1.27 mmol) und nach 48 h erneut Bromethanol (200 μl , 2.82 mmol) zugegeben und das Gemisch für 2 Wochen gerührt. Zur Aufarbeitung wird Wasser (50 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit



Essigester (2x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 1:1) wird das Sulfonamid **197** (84.4 mg, 234 μmol , 34 %) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.34 (s, 9H, 13-H), 3.03 (s., br, 1H, 5-H), 3.45 (t, J = 5.1 Hz, 2H, 3-H), 3.65 (t, J = 5.1 Hz, 2H, 4-H), 4.05 (s, 2H, 2-H), 7.55 (m, 1H, 11-H), 7.64-7.66 (m, 2H, 9-H, 10-H), 7.98 (m, 2H, 8-H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3): δ = 27.6 (13-C), 50.1 (2-C), 51.6 (4-C), 60.1 (3-C), 82.6 (12-C), 123.9 (11-C), 130.6 (8-C), 131.7 (10-C), 132.6 (6-C), 133.7 (9-C), 147.8 (7-C), 168.8 (1-C). **IR (KBr)**: 1740 (CO), 3448 (OH) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 305 (69) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$, 378 (100) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 738 (33) $[2\text{M}+\text{NH}_4]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 383.0883, berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{S}^+$: 383.0883. **R_f**: 0.41 (EE).

5.6 2-((2-Hydroxyethyl)amino)essigsäure-*tert*-butylester (**200**, TZD-133)

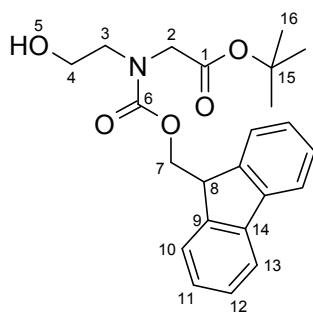


2-Aminoethanol (20.0 mL, 334 mmol) wird in DMF (100 mL) vorgelegt und mit DIPEA (8.35 mL, 49.1 mmol) versetzt. Anschließend wird Bromessigsäure-*tert*-butylester (10.53, 54.0 mmol) hinzugegeben und der Ansatz für 48 h auf Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird Wasser (200 mL) hinzugegeben und die Mischung mit Essigester (3x 200 mL) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Aminosäureester **200** (8.90 g, 50.8 mmol) in 94 % Ausbeute als schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.46 (s, 9 H, 8-H), 2.79 (t, J = 5.0 Hz, 2H, 4-H), 3.34 (s, 2H, 2-H), 3.42 (s, br, 2H, 3-H, 6-H), 3.63 (t, J = 5.0 Hz, 2H, 5-H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3): δ = 28.1 (8-C), 50.8 (2-C), 50.9 (4-C), 60.5 (5-C), 81.8 (7-C), 171.5 (1-C). **IR (KBr)**: 3407 (OH), 1735 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: 120 (100) $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$, 176 (6) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 120.0660, berechnet für $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$: 120.0655, m/z = 198.1108, berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NNaO}_3^+$: 198.1101. **R_f**: 0.42 (EE/EtOH, 1:1 + 1Tr. TEA).

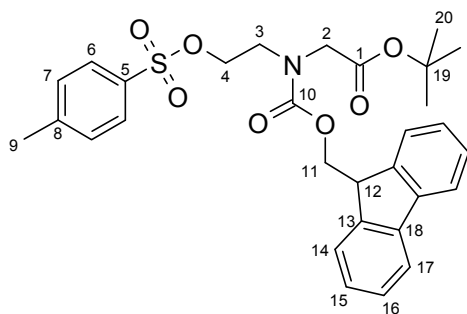
5.7 2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(2-hydroxyethyl)amino)essigsäure-*tert*-butylester (**201**, TZD-135)

Der Aminosäureester **200** (12.11 g, 69.1 mmol) und Natriumhydrogencarbonat (20.32 g, 241 mmol) werden in Wasser/THF (2:1, 1L) gelöst und portionsweise mit Fmoc-Cl (18.77, 72.6 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wird Essigester (300 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Essigester (300 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird mit Natriumchlorid gesättigt und erneut mit Essigester (2x 300 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie (CH/EE, 2:1) gereinigt. Der Fmoc-Aminosäureester **201** (26.0 g, 69.1 mmol) wird in quantitativer Ausbeute als hochviskose farblose Flüssigkeit erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.46, 1.48 (jeweils s, 9H, 16-H), 3.31 (m, 1H, 5-H), 3.37 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, 3-H), 3.52 (m, 2H, 3-H, 4-H), 3.77 (m, 1H, 4-H), 3.90, 3.94 (jeweils s, 2H, 2-H), 4.21 (t, *J* = 6.2 Hz, 0.5H, 8-H), 4.26 (t, *J* = 6.3 Hz, 0.5H, 8-H), 4.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 7-H), 4.50 (d, *J* = 6.3, 1H, 7-H), 7.31 (m, 2H, 12-H), 7.40 (ψt, *J* = 7.4 Hz, 2H, 11-H), 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 13-H), 7.76 (d, 7.5, 2H, 10-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 28.0 (16-C), 47.3, 47.4 (8-C), 51.4, 51.6 (2-C), 52.3, 53.1 (3-C), 60.7, 61.0 (4-C), 67.7, 68.0 (7-C), 82.7, 82.8 (15-C), 119.9, 120.0 (10-C), 124.9, 125.1 (13-C), 127.1, 127.3 (12-C), 127.7, 127.8 (11-C), 141.3, 141.4 (14-C), 143.8, 143.9 (9-C), 156.3 (6-C), 170.6, 171.0 (1-C). **IR (KBr)**: 3469 (OH), 1743 (CO), 1706 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: 120 (49), [M-C₄H₈-C₁₄H₁₉+2H]⁺, 179 (100) [C₁₄H₁₉]⁺, 342 (71) [M-C₄H₈+H]⁺. **R_f**: 0.24 (CH/EE, 1:1).

5.8 ((9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(2-(toluol-4-sulfonyloxy)-ethyl)-amino)essigsäure-tert-butylester (203, TZD-145)

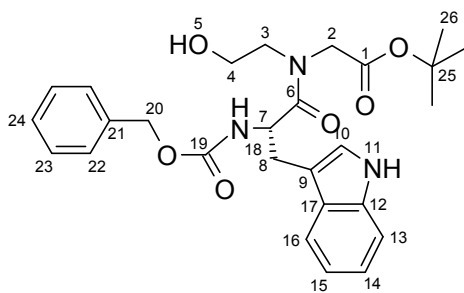


395 mg (0.99 mmol) des Alkohols 201 werden in 4 mL Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 397 mg Tos-Cl hinzugegeben und die Mischung bei 0 °C für 2 Tage gerührt. Danach wird die Mischung mit 20 mL EE versetzt und zweimal mit jeweils 10 mL 5%iger KH₂SO₄-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Mg₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhält man 264 mg (0.48 mmol, 48 %) des Produktes als farbloses Öl.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1.33, 1.34 (jeweils s, 9H, 20-H), 2.30, 2.32 (jeweils s, 3H, 9-H), 3.32 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, 3-H), 3.46 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, 3-H), 3.73, 3.79 (jeweils s, 2H, 2-H), 3.85 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, 4-H), 4.09 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 4-H), 4.13-4.26 (m, 3H, 11-H, 12-H), 7.28 (ψt, *J* = 7.34 Hz, 2H, 15-H), 7.38 (ψdd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 13.1 Hz, 4H, 7-H, 13-H), 7.57 (ψd, *J* = 7.4 Hz, 2H, 14-H), 7.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 7.73 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 7.85 (ψt, *J* = 8.4 Hz, 2H, 16-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 20.9, 20.9 (9-C), 27.6 (20-C), 46.4, 46.5 (12-C), 47.0 (3-C), 49.6, 49.9 (2-C), 67.1 (11-C), 67.9, 68.0 (4-C), 80.9, 81.1 (19-C), 120.0, 120.1 (17-C), 124.8, 124.9 (14-C), 127.0, 127.1 (15-C), 127.4, 127.5 (16-C), 127.6, 127.7 (6-C), 130.0 (7-C), 132.1, 131.2 (5-C), 140.6 (18-C), 143.5, 143.7 (13-C), 144.8, 144.9 (8-C), 155.0, 155.2 (10-C), 168.2, 168.4 (1-C). **IR (KBr)**: 1742 (CO), 1709 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: 274 (25) [M-C₁₅H₁₀O₂-C₄H₈+H]⁺, 496 (93) [M-C₄H₈+H]⁺, 569 (100) [M+NH₄]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 421.1786., berechnet für C₂₃H₂₁NNaO₅⁺: 420.1781.. **R_f**: 0.15 (CH/EE, 8:2).

5.9 ((2-Benzoyloxycarbonylamino-3-(1H-indol-3-yl)-propionyl)-(2-hydroxyethyl)-aminoessigsäure-tert-butylester (204, TZD-146)

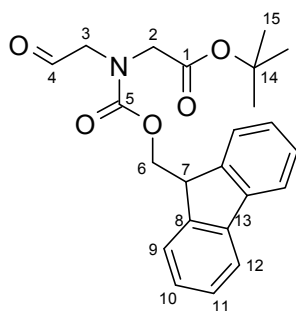
Das Amin **200** (122 mg, 0.70 mmol), Cbz-Trp-OH (202 mg, 0.60 mmol) und HATU (250 mg, 0.66 mmol) werden in Acetonitril (10 mL) gelöst und mit DIPEA (203 µl, 1.20 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 5 h wird gesättigte Natriumchloridlösung (10 mL) zugegeben und die Mischung mit Essigester



(5x 15 mL) extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit Salzsäure (1 M, 10 mL), Wasser (10 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (10 mL) und gesättigter Natriumchloridlösung (10 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie (CH/EE, 1:1) wird das Dipeptid **204** (231 mg, 0.46 mmol, 78 %) als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.40, 1.46 (je s, 9H, 26-H), 3.00-3.92 (m, 8H, 2-H, 3-H, 4-H, 8-H), 5.00-5.10 (m, 3H, 7-H, 20-H), 6.95-7.40 (m, 11H, 10-H, 13-H, 14-H, 15-H, 16-H, 18-H, 22-H, 23-H, 24-H), 7.55-7.65 (m, 1H, 11-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 27.9, 28.0 (26-C), 29.0 (8-C), 50.3 (2-C), 51.5 (7-C), 51.7, 51.8 (3-C), 59.9, 60.7 (4-C), 82.6 (25-C), 110.1 (9-C), 111.2, 118.5, 119.6, 122.1, 123.2 (10-C, 13-C, 14-C, 15-C, 16-C), 127.5 (17-C), 127.9, 128.0, 128.4 (22-C, 23-C, 24-C), 136.1 (21-C), 136.3 (12-C), 156.0 (19-C), 169.9 (1-C), 173.2 (6-C). **IR (KBr)**: 1737 (CO), 1724 (CO), 1665 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: .440 (100) [M-C₄H₈+H]⁺, 496 (86) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 518.2261, berechnet für C₂₇H₃₃N₃NaO₆⁺: 518.2262. **R_f**: 0.72 (EE/EtOH, 1:1 + 1 Tr. HOAc).

5.10 ((9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-2-oxoethyl)-aminoessigsäure-tert-butylester (206, TZD-148)

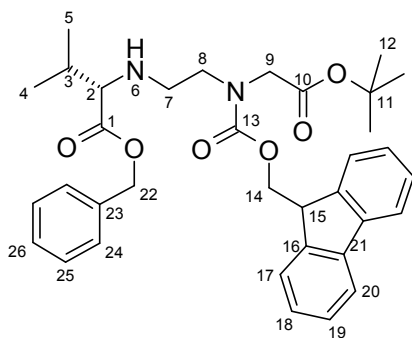


Oxalylchlorid (1.2 mL, 64.1 mmol) wird in trockenem DCM (100 mL) gelöst das Gemisch im Acetonbad auf -78 °C gekühlt. Dazu wird DMSO (1.7 mL, 23.9 mmol) gegeben und nach 40 Minuten Rühren wird über eine Kanüle eine vorgekühlte Lösung des Alkohols **201** (4.67 g, 11.7 mmol) in Dichlormethan (20 mL) zum Reaktionsgemisch gegeben. Nach Rühren für 30 Minuten wird DIPEA (11.6 mL) hinzugegeben und die Mischung für weitere 10 Minuten bei -78° C gerührt. Danach wird die Mischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in EE (50 mL) aufgenommen. Die Lösung wird mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Aldehyd **206** (4.49 g, 11.3 mmol) wird in 98 % als farbloses Öl erhalten. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung direkt in der reduktiven Aminierung zu **207** bzw zu **223** umgesetzt.

Die Lösung wird mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Aldehyd **206** (4.49 g, 11.3 mmol) wird in 98 % als farbloses Öl erhalten. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung direkt in der reduktiven Aminierung zu **207** bzw zu **223** umgesetzt.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1.45, 1.47 (jeweils s, 9H, 15-H), 3.83, 4.10 (m, 2H, 3-H), 4.00 (m, 2H, 2-H), 4.23 (7-H), 4.45, 4.53 (6-H), 7.30 (m, 2H, 11H), 7.38 (m, 2H, 10-H), 7.56 (m, 2H, 9-H), 7.74 (m, 2H, 12-H), 9.37, 9.66 (jeweils s, 1H, 4-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 27.9 (15-C), 47.0, 47.1 (7-C), 50.4, 50.6 (2-C), 57.5, 58.1 (6-C), 67.9, 68.3 (3-C), 82.3, 82.4 (14-C), 119.9 (12-C), 124.6, 124.9 (10-C), 127.0 (9-C), 127.6, 127.7 (11-C), 141.2 (13-C), 143.5, 143.6 (8-C), 155.7, 156.1 (5-C), 168.2, 168.4 (1-C), 198.2, 198.3 (4-C). **IR (KBr)**: 1740 (CO), 1709 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: .340 [M-C₄H₈+H]⁺, 396 [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 418.1624, berechnet für C₂₃H₂₅NNaO₅⁺: 418.1625. **R_f**: 0.41 (CH/EE, 1:1).

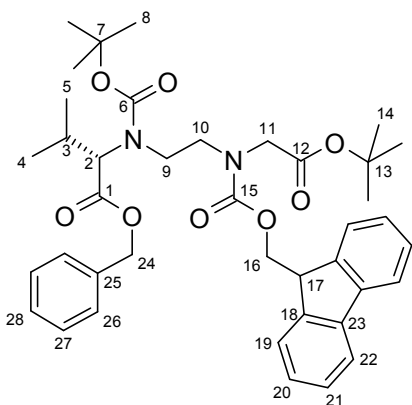
5.11 *S*-2-(2-(*tert*-Butoxycarbonylmethyl-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-amino)ethylamino)-3-methyl-buttersäurebenzylester (**207**, TZD-149)



Das Rohprodukt des Aldehyds **206** (4.49 g, 11.3 mmol) wird in trockenem DMF (30 mL) gelöst. Dazu wird Valinbenzylester-*p*-tosylat (5.29 g, 13.9 mmol) und Natriumtriacetoxyborhydrid (2.60 g, 15.9 mmol) gegeben und die Mischung für 24h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird erneut Natrium-triacetoxyborhydrid (2.96 g, 18.0 mmol) hinzugegeben und der Ansatz weitere 24 h gerührt. Danach wird Wasser (250 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit Essigester (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 8:2) wird das Amin **207** (5.17 g, 8.8 mmol, 77 % Ausbeute über 2 Stufen) als schwach gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.83 (m, 6H, 4-H, 5-H), 1.38 (s, 9H, 12-H), 1.35 (s, 1H, 3-H), 2.33 (m, 0.5 H, 7-H), 2.54 (m, 0.5 H, 7-H), 2.65 (m, 0.5 H, 7-H), 2.81(m, 0.5 H, 7-H), 2.85 (d, *J* = 5.9 Hz, 0.5 H, 2-H), 2.99 (d, *J* = 5.9 Hz, 0.5 H, 2-H), 3.25 (m, 1H, 8-H), 3.37 (m, 1H, 8-H), 3.87 (m, 2H, 9-H), 4.15 (m, 1H, 15-H), 4.33 (m, 2H, 14-H), 5.07 (m, 2H, 22-H), 7.20-7.33 (m, 9H, 18-H, 19-H, 24-H, 25-H, 26-H), 7.50 (ψd, *J* = 7.5 Hz, 2H, 17-H), 7.86 (ψt, *J* = 6.8 Hz, 20-H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 17.6, 18.2 (4-C, 5-C), 27.1 (12-C), 30.6 (3-C), 45.8, 46.1 (7-C), 46.3, 46.3 (15-C), 47.5, 48.0 (8-C), 49.4, 49.5 (9-C), 65.3 (22-C), 66.5, 66.6 (2-C), 66.8 (14-C), 80.7, 80.9 (11-C), 118.9, 124.0, 124.1 126.0, 126.1, 126.9, 127.3, 127.4, 127.5, 127.6 (17-C, 18-C, 19-C, 20-C, 24-C, 25-C, 26-C), 134.8, 134.8 (23-C), 140.3, 140.3 (16-C), 143.0, 143.0 (21-C), 155.1, 155.4 (13-C), 168.0, 168.0 (10-C), 173.6, 173.7 (1-C). IR (KBr): 1740 (CO), 1708 (CO) cm⁻¹. HPLC-ESI-MS: 587 (100) [M+H]⁺. HR-ESI-MS: *m/z* = 587.3116, berechnet für C₃₅H₄₃N₂O₆⁺: 587.3116. R_f: 0.56 (CH/EE, 1:1).

5.12 (*S*)-2-((2-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutansäurebenzylester (**208**, TZD-150)

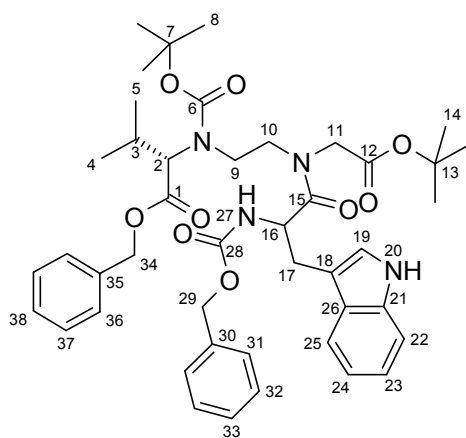


Das Amin **207** (5.40g, 9.20 mmol) wird in THF (50 mL) gelöst. Dazu wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (50 mL) und Boc-Anhydrid (13.56 g, 62.1 mmol) gegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 44 h wird erneut Boc-Anhydrid (8.04 g, 36.84 mmol) hinzugegeben und für weitere 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird Wasser (100 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit Essigester (3x, 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH-EE, 9:1) wird das Carbamat **208** (5.55 g, 8.09 mmol, 88 %) als farbloses zähflüssiges Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.87–1.04 (m, 6H, 4-H, 5-H), 1.41–1.55 (m, 18H, 8-H, 14-H), 2.16-2.45 (m, 1H, 3-H), 3.15–4.49 (m, 10H, 2-H, 9-H, 10-H, 11-H, 16-H, 17-H), 5.11-5.19 (m, 2H, 24-H), 7.28–7.80 (m, 13H,

19-H, 20-H, 21-H, 22-H, 26-H, 27-H, 28-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.9, 19.0, 19.2, 19.4, 19.9, 20.6, 20.9, 21.1$ (4-C, 5-C), 27.4, 28.1, 28.4, 28.7 (8-C, 14-C, 3-C), 42.6, 43.2 (9-C), 45.1, 45.2, 46.5, 47.0 (10-C), 47.2, 47.3 (17-C), 50.1, 50.2, 50.5, 50.6 (11-C), 64.1 (2-C), 66.5, 66.5, 66.6, 66.7 (24-C), 67.7, 67.8, 67.9 (16-C), 80.6, 80.7 (13-C), 81.6, 81.8, 81.8, 81.9 (7-C), 120.0, 125.2, 127.7, 128.2, 128.3, 128.5 (19-C, 20-C, 21-C, 22-C, 26-C, 27-C, 28-C), 135.7 (25-C), 141.3 (23-C), 143.9, 144.0 (18-C), 155.0, 155.1, 155.6, 155.7, 155.8, 156.0, 158.2 (6-C, 15-C), 168.9, 168.9 (12-C), 170.8, 171.2, 171.3, 171.4 (1-C). **IR (KBr)**: 1744 (CO), 1698 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 531 (14) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}+\text{H}]^+$, 587 (49) $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}+\text{H}]^+$, 631 (0.14) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$, 687 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: $m/z = 709.3457$, berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{NaO}_8^+$: 709.3459. **R_f**: 0.54 (CH/EE, 7:3).

5.13 (11S)-5-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-7-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-10-(*tert*-butoxycarbonyl)-11-isopropyl-3,6-dioxo-1-phenyl-2-oxa-4,7,10-triazadodecansäurebenzylester (**210**, TZD-152)

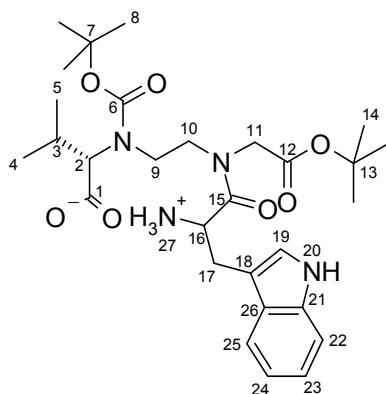


Die Fmoc-geschützten Aminosäure **208** (3.56 g, 5.18 mmol) wird in DCM/DEA (1:1, 40 mL) gelöst und für 70 Minuten intensiv gerührt. Anschließend werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand für 10 Minuten im Hochvakuum getrocknet. Der getrocknete Rückstand wird in DCM (30 mL) gelöst und mit Cbz-Trp-OH (3.69 g, 10.90 mmol) und BOP-Cl (2.81 g, 11.0 mmol) versetzt. Bei 0 °C wird DIPEA (3.5 mL, 20.6 mmol) hinzugegeben und die Mischung für 5 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Nach weiteren 17 h Rühren bei Raumtemperatur wird Wasser (30 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (2x

30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 17:3) wird das Peptid **210** (2.33 g, 2.96 mmol, 57 %) als farbloser Schaum erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.7-1.1$ (m, 6H, 4-H, 5-H), 1.30-1.55 (m, 18H, 8-H, 14-H), 2.10-2.40 (m, 1H, 3-H), 3.00-5.90 (m, 14H, 2-H, 9-H, 10-H, 11-H, 16-H, 17-H, 29-H, 34-H), 7.00-8.10 (m, 16 H, 19-H, 20-H, 22-H, 23-H, 24-H, 25-H, 27-H, 31-H, 32-H, 33-H, 36-H, 37-H, 38-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.8-20.8$ (4-C, 5-C), 27.8, 28.0, 28.2, 28.3 (3-C, 8-C, 14-C), 28.6, 28.8, 29.3, 29.7 (17-C), 41.6-42.2 (9-C), 46.7, 47.4 (10-C), 49.1, 49.5 (11-C), 51.3, 51.5 (16-C), 63.5, 64.2 (2-C), 66.4, 66.6, 66.7 (29-C, 34-C), 80.7, 80.8, 81.0, 81.5, 81.7, 82.6 (7-C, 13-C), 110.0, 110.1 (18-C), 111.0, 111.1 (22-C), 118.7 (25-C), 119.5, 119.6 (24-C), 121.9, 122.0 (23-C), 123.6, 123.7 (19-C), 127.6, 127.7 (26-C), 127.9-128.6 (31-C, 32-C, 33-C, 36-C, 37-C, 38-C), 135.5-136.1 (30-C, 35-C), 136.4 (21-C), 154.8-155.8 (6-C, 28-C), 168.1, 168.3 (12-C), 170.8-172.9 (1-C, 15-C). **IR (KBr)**: 1736, 1701, 1655 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: 785 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: $m/z = 807.3940$, berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{NaO}_9^+$: 807.3940. **R_f**: 0.24 (CH/EE, 7:3)

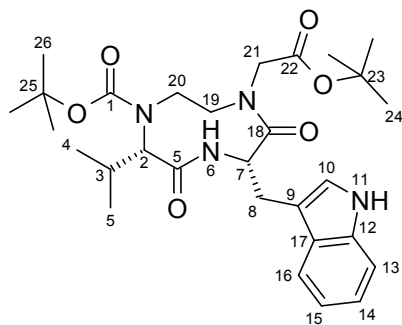
5.14 (2S)-2-((2-(2-Ammonio-N-(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)ethyl)(tert-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanoat (**212**, TZD-155)



Das Peptid **210** (2.21 g, 2.81 mmol) wird in Ethanol (200 mL) gelöst und mit Palladiumhydroxid auf Aktivkohle (690 mg) versetzt. Anschließend wird die Mischung mit Argon entgast und anschließend Wasserstoff durch die Reaktionsmischung geleitet. Danach wird das Gemisch eine Stunde bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Filtration des Katalysators wird in 94 % Ausbeute das Produkt **212** (1.48 g, 2.64 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN): δ = 0.74-0.95 (m, 6H, 4-H, 5-H), 1.33-1.49 (m, 18H, 8-H, 14-H), 2.00-2.22 (m, 1H, 3-H), 2.45-5.01 (m, 10H, 2-H, 9-H, 10-H, 11-H, 16-H, 17-H), 7.00-8.05 (m, 6H, 19-H, 20-H, 22-H, 23-H, 24-H, 25-H). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃CN): δ = 18.7-20.7 (4-C, 5-C), 28.2-29.5 (3-C, 8-C, 14-C, 17-C), 42.1-43.2 (9-C), 46.5-47.7 (10-C), 49.5-51.0 (11-C), 56.4-57.3 (16-C), 65.1-67.0 (2-C), 80.5-83.7 (7-C, 13-C), 109.0-109.4 (18-C), 112.2-112.5 (22-C), 117.1-118.0 (25-C), 119.1-119.3 (24-C), 119.8-120.1 (23-C), 122.3-122.6 (19-C), 128.4-128.8 (26-C), 137.1-137.6 (21-C), 156.2-156.8 (7-C), 168.4-169.1 (12-C), 173.4-174.6 (1-C, 15-C). IR (KBr): 1735, 1654 (CO) cm⁻¹. HPLC-ESI-MS: m/z (%) = 561 (100) [M+H]⁺. HR-ESI-MS: m/z = 561.3289, berechnet für C₂₉H₄₅N₄O₇⁺: 561.3283. R_f: 0.25 (EE/EtOH, 1:1).

5.15 (2S,5S)-7-tert-Butoxycarbonylmethyl-5-(1H-indol-3ylmethyl-2-isopropyl-3,6-dioxo-[1,4,7]triazolan-1-carboxylsäure-tert-butylester (**213**, TZD-157)

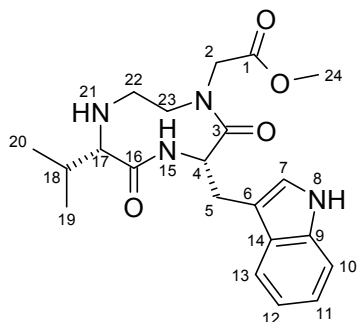


HATU (2.23 g, 5.86 mmol) und DIPEA (1.4 mL, 8.23 mmol) wird in DCM (120 mL) vorgelegt. Dazu wird langsam, mit einem Fluss von 2 mL/h, das Peptid **212** (1.53 g, 2.74 mmol) gelöst in DCM (20 mL) zugetropft. Nach 18 h Reaktionszeit wird Wasser (100 mL) hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (2x 50 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **213** wird säulenchromatographisch (CH/EE, 6:4) aufgereinigt und als farbloser Feststoff (950 mg, 1.75 mmol, 64 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 4-H), 0.92 (d, J = 6.3 Hz, 3H, 5-H), 1.44, 1.45 (jeweils s, 18H, 24-H, 26-H), 2.64-2.75 (m, 2H, 3-H, 20-H), 3.05-3.15 (m, 3H, 8-H, 21-H, 2-H), 3.31 (dd, J = 7.1 Hz, J = 14.4 Hz, 1H, 8-H), 3.53 (d, J = 17.9 Hz, 1H, 21-H), 3.80-3.91 (m, 1H, 19-H), 4.17-4.30 (m, 1H, 20-H), 4.69 (ψq, J = 7.3 Hz, 1H, 7-H), 4.85 (d, J = 17.9 Hz, 1H, 21-H), 5.92 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 6-H), 7.07 (s, 1H, 10-H), 7.13 (dd, J = 7.3 Hz, J = 7.3 Hz, 1H, 15-H), 7.18 (dd, J = 7.4 Hz, J = 7.4 Hz, 1H, 14-H), 7.35 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 13-H), 7.56 (d, J = 7.7 Hz, 1H, 16-H), 8.66 (s, 1H, 11-H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 18.6, 21.9 (4-C, 5-C), 28.0, 28.1 (24-C, 26-C), 28.1 (3-C), 29.3 (8-C), 45.5 (19-C), 46.1 (20-C), 48.4 (21-C), 50.4 (7-C), 66.0 (2-C), 81.4, 82.1 (23-C, 25-C), 109.4 (9-C), 111.5 (13-C), 117.6 (16-C), 119.4 (15-C), 121.8 (14-C), 123.7 (10-

C), 127.0 (17-C), 136.2 (12-C), 155.3 (1-C), 168.8 (22-C), 170.0 (5-C), 173.0 (18-C). **IR (KBr):** 1794, 1696, 1670 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 431 (49) $[\text{M}-2\text{x}\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$, 487 (100) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$, 543 (38) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 565.2999, berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{NaO}_6^+$: 565.2997. **R_f:** 0.26 (CH/EE, 1:1).

5.16 2-((3*S*,6*S*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-6-isopropyl-2,5-dioxo-1,4,7-triazonan-1-yl)essigsäuremethylester (215, TZD-163)



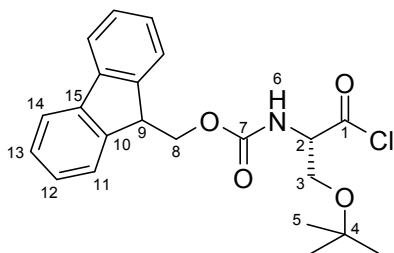
Das Cyclopeptid **213** (300 mg, 553 μmol) wird in DCM (3 mL) gelöst und bei 0 °C mit Triethylsilan (880 μl , 5.53 mmol) und TFA (1.2 mL, 17.4 mmol) versetzt. Nach 2.5 h Rühren bei Raumtemperatur werden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Zum getrockneten Rückstand wird trockener Methanol (5 mL) gegeben und unter Eiskühlung langsam Thionylchlorid (400 μl , 5.53 mmol) hinzugegeben. Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur werden die flüchtigen Bestandteile destillativ abgetrennt, gesättigte NaHCO_3 -Lösung (10 mL) hinzugegeben und die wässrige Phase

mit Essigester (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/EtOH, 9:1) wird das Cyclopeptid **215** (160.5 mg, 400 μmol , 73 %) als schwach gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH): δ = 0.81 (d, J = 2.9 Hz, 3H, 19-H), 0.83 (d, J = 3.0 Hz, 3H, 20-H), 1.74 (m, 1H, 18-), 1.93 (ddd, J = 6.0 Hz, J = 7.4 Hz, J = 12.0 Hz, 1H, 22-H), 2.44 (ddd, J = 5.6 Hz, J = 5.6 Hz, J = 11.7 Hz, 1H, 22-H), 2.64 (d, J = 6.2 Hz, 1H, 17-H), 2.77 (d, J = 17.7 Hz, 1H, 2-H), 2.99 (ddd, J = 5.8 Hz, J = 7.4 Hz, J = 13.6 Hz, 1H, 23-H), 3.09 (dd, J = 4.3 Hz, J = 14.7 Hz, 1H, 5-H), 3.15 (ddd, J = 5.7 Hz, J = 5.7 Hz, J = 13.7 Hz, 23-H), 3.48 (m, 2H, 2-H, 5-H), 3.39 (s, 3H, 24-H), 4.24 (ψt , J = 3.9 Hz, 1H, 4-H), 6.99 (ψt , J = 7.5 Hz, 1H, 11-H), 7.03 (s, 1H, 7-H), 7.09 (ψt , J = 7.7 Hz, 1H, 12-H), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 10-H), 7.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 13-H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, MeOH): δ = 19.0, 19.4 (19-C, 20-C), 31.4 (5-C), 32.5 (18-C), 46.5 (22-C), 47.5 (23-C), 51.2 (2-C), 51.8 (24-C), 57.6 (4-C), 68.2 (17-C), 108.9 (6-C), 112.4 (10-C), 119.8 (13-C), 120.1 (12-C), 122.7 (11-C), 126.1 (7-C), 128.6 (14-C), 137.9 (9-C), 168.6, 168.6 (3-C, 16-C), 176.6 (1-C). **IR (KBr):** 1733 (CO), 1654 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 401(100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 401.2176, berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4^+$: 401.2183; m/z = 423.2000, berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{NaO}_4^+$: 423.2003 **R_f:** 0.36 (EE/EtOH, 8:2).

5.17 (S)-3-tert-Butoxy-1-chlor-1-oxopropan-2-ylcarbamidsäure-(9*H*-fluoren-9-yl)methylester (216b, TZD-182)

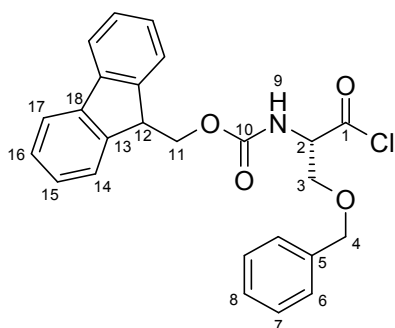
Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (1.03 g, 2.69 mmol) wird in trockenem DCM (10 mL) gelöst und mit Oxalylchlorid (250 μL , 2.91 mol) versetzt. Dazu wird DMF (20 μl) gegeben und die Lösung für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Hexan (10 mL) wird über Watte filtriert und das Filtrat eingeeengt. Das Säurechlorid **216b** (1.06 g, 2.63 mmol, 98 %) wird als schwach gelbes Öl erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.24 (s, 9H, 5-H), 3.67 (dd, *J* = 9.3 Hz, *J* = 2.9 Hz, 1H, 3-H), 4.14 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, 3-H), 4.29 (ψt, *J* = 6.9 Hz, 1H, 9-H), 4.43 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1H, 8-H), 4.53 (dd, *J* = 10.6 Hz, *J* = 6.9 Hz, 1H, 8-H), 4.77 (m, 1H, 2-H), 5.78 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, 6-H), 7.36 (ψt, *J* = 7.4 Hz, 2H, 12-H), 7.44 (ψt, *J* = 7.4 Hz, 2H, 13-H), 7.64 (ψt, *J* = 6.5 Hz, 2H, 11-H), 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 14-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 27.2 (5-C), 47.1 (9-C),

61.0 (3-C), 63.3 (2-C), 67.4 (8-C), 74.1 (4-C), 119.9 (11-C), 124.9, 125.0 (12-C), 127.0, 127.1 (13-C), 127.7 (14-C), 141.3 (15-C), 143.5, 143.7 (10-C), 155.8 (7-C), 173.2 (1-C). **IR (KBr):** 1788 (CO), 1728 (CO) cm⁻¹.

5.18 (S)-3-Benzyloxy-1-chloro-1-oxopropan-2-ylcarbamidsäure-(9H-fluoren-9-yl)methylester (216e, TZD-185)



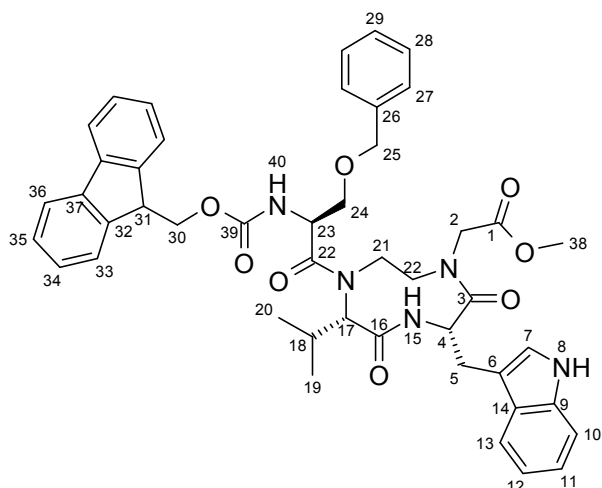
Fmoc-Ser(Bn)-OH (260 mg, 624 μmol) wird in trockenem DCM (3 mL) gelöst und mit Oxalylchlorid (70 μL, 816 μmol) versetzt. Dazu wird DMF (10 μl) gegeben und die Lösung für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Hexan (10 mL) wird über Watte filtriert und das Filtrat eingengt. Das Säurechlorid **216e** (250 mg, 574 μmol, 92 %) wird als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.76 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1H, 3-H), 4.20 (dd, *J* = 9.8 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H, 3H), 4.26 (ψt, *J* = 6.9 Hz, 1H, 12-H), 4.41 (d2, *J* = 10.5 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1H, 11-H), 4.52 (dd, *J* = 10.7 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, 11-H), 4.60 (ψd., *J* = 2.6 Hz, 2H, 4-H), 4.77 (m, 1H, 2-H),

5.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 9-H), 7.33-7.47 (m, 9H, 6-H, 7-H, 8-H, 15-H, 16-H), 7.63 (ψt, *J* = 6.4 Hz, 2H, 14-H), 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 2-H, 17-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 47.1 (12-C), 63.1 (2-C), 67.5 (11-C), 68.5 (3-C), 73.7 (4-C) 120.0 (14-C), 125.0 125.1 (15-C), 127.1 (16-C), 127.7 (17-C), 127.8, 128.2, 128.6 (6-C, 7-C, 8-C), 136.6 (5-C), 141.3 (18-C), 143.5 (13-C), 155.7 (10-C), 173.1 (1-C). **IR (KBr):** 1784 (CO), 1719 (CO) cm⁻¹.

5.19 2-((3S,6S)-3-((1H-Indol-3-yl)methyl)-7-((S)-2-((9H-fluoren-9-yl)methoxy)-carbonylamino)-3-(benzyloxy)propanoyl)-6-isopropyl-2,5-dioxo-1,4,7-triazonan-1-yl)essigsäuremethylester (217d, TZD-183)

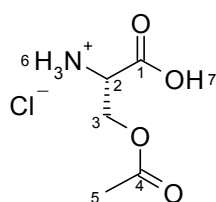
Das Cyclopeptid **215** (120 mg, 300 μmol) wird in trockenem Acetonitril (5 mL) gelöst und mit Fmoc-Ser(Bn)-OH (126 mg, 303 μmol), HATU (126.5 mg, 333 μmol) und DIPEA (125 μl, 735 μmol) versetzt. Nach Rühren für 6 h bei Raumtemperatur wird erneut Fmoc-Ser(Bn)-OH (133 mg, 318 μmol), HATU (118.5 mg, 312 μmol) und DIPEA (125 μl, 735 μmol) hinzugegeben und der Ansatz für 18 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wird Wasser (20 mL) hinzugegeben und der Ansatz mit Ethylacetat (4x 20 mL) extrahiert. Nach zweifacher chromatographischer Reinigung (CH/EE, 6:4; Tol/EE, 2:1) wird das Acylierungsprodukt **217d** (9.8 mg, 12.3 μmol, 4 %) als farbloses Öl erhalten und das Edukt **215** (97.9 mg, 244 μmol, 81 %) reisoliert.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 19-H), 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 20 H), 1.77 (m, 1H, 18-H), 2.02 (m, 1H, 21-H), 2.34 (d, *J* = 18.3 Hz, 1H, 2-H), 2.57 (m, 1H, 21-H), 2.66 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, 17-H), 2.98 (m, 1H, 22-H), 3.08 (m, 1H, 22-H), 3.35 (d, *J* = 18.3 Hz, 1H, 2-H), 3.41 (dd, *J* = 14.9 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H, 5-H), 3.62 (dd, *J* = 14.9 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, 5-H), 3.72 (s, 3H, 38-H), 3.75 (m, 2H, 24-H), 4.31 (ψt, *J* = 6.6 Hz, 1H, 31-H), 4.41-4.51 (m, 3H, 25-H, 30-H), 4.69 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, 25-H), 5.23 (m, 1H, 4-H), 5.82 (m, 1H, 23-H), 5.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, 40-H), 7.09 (s, 1H, 7-H), 7.13 (ψt, 7.4 Hz, 1H, 12-H), 7.20 (ψt, 7.4

Hz, 2H, 11-H, 29-H), 7.25-7.37 (m, 7H, 10-H, 27-H, 28-H, 35-H), 7.43 (m, 2H, 34-H), 7.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, 13-H), 7.69 (ψt, *J* = 7.4 Hz, 2H, 36-H), 7.79-7.81 (m, 2H, 33-H), 8.20 (s, 1H, 8-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 18.5 (19-C), 19.2 (20-C), 27.8 (5-C), 31.4 (18-C), 45.5 (21-C), 45.8 (22-C), 47.2 (31-C), 51.3 (2-C), 51.5 (38-C), 57.2 (23-C), 58.7 (4-C), 67.1 (17-C), 67.3 (30-C), 68.5 (24-C), 73.1 (25-C), 109.1 (6-C), 111.2 (10-C), 119.2 (13-C), 120.0 (33-C), 120.1 (12-C), 122.6 (11-C), 125.2 (36-C), 125.5 (7-C), 127.1, 127.1, 127.7, 127.8, 127.9, 128.2, 128.5 (27-C, 28-C, 34-C, 35-C), 127.2 (14-C), 129.0 (29-C), 135.9 (9-C), 137.3 (26-C), 141.3, 143.8, 143.9 (32-C, 37-C), 156.4 (39-C), 166.4, 167.1, 172.5, 175.2 (1-C, 3-C, 16-C, 22-C). **IR (KBr):** 1718 (CO), 1654 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 800 (100) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS:** *m/z* = 800.3664, berechnet für C₄₆H₅₀N₅O₈⁺: 800.3659. **R_f:** 0.61 (EE).

5.20 L-Serin-O-acetyl Hydrochlorid (219, TZD-190)

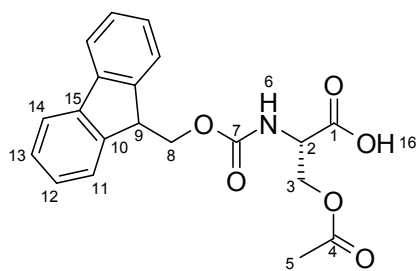


L-Serin (572 mg, 5.44 mmol) wird in Salzsäure (6 M, 1 mL) gelöst, mit Eisessig (1 mL) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird langsam Acetylchlorid (10 mL) hinzugegeben und das Gemisch für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt mit Diethylether (20 mL) ausgefällt und filtriert. Nach Trocknen im Vakuum wird Acetyl-Serin **219** (912 mg, 4.97 mmol, 91 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeOH): δ = 2.13 (s, 3H, 5-H), 4.41 (dd, *J* = 4.7 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1H, 2-H), 4.53 (dd, *J* = 12.2 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, 3-H), 4.61 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 3.3 Hz, 1H, 3-H), 5.05 (s, br, 3H, 6-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeOH): δ = 20.5 (5-C), 56.0 (2-C), 62.7 (3-C), 168.9 (4-C), 171.8 (1-C). **HPLC-ESI-MS:** *m/z* (%) = 148 [M+H]⁺. **IR (KBr):** 1753 (CO) cm⁻¹.

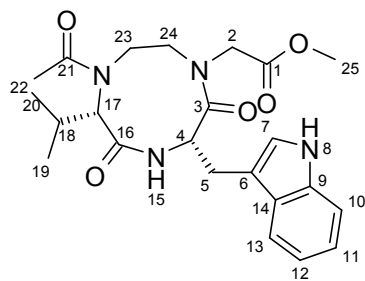
5.21 (S)-2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-3-acetoxypropionsäure (220, TZD-191)

L-Acetyl-Serin **219** (812 mg, 4.42 mmol) wird in THF/Wasser (2:1, 150 mL) gelöst und mit Natriumhydrogencarbonat (1.80 g, 17.7 mmol) versetzt. Anschließend wird portionsweise Fmoc-Cl (1.28 g, 4.95 mmol) hinzugegeben und der Ansatz für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit Salzsäure (1 M) auf pH 3 angesäuert und mit Essigester (3x, 60 mL) extrahiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 1:1 + 1 % HOAc - EE + 1 % HOAc) wird die Fmoc-Aminosäure **220** (962.5 mg, 2.60 mmol, 59 %) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO): δ = 2.01 (s, 3H, 5-H), 4.17 (dd, J = 10.7 Hz, J = 6.6 Hz, 1H, 9-H), 4.25 (q, J = 7.0 Hz, 1H, 2-H), 4.31-4.38 (m, 4H, 3-H, 8-H), 7.34 (q, J = 7.4 Hz, 2H, 12-H), 7.43 (q, J = 7.5 Hz, 2H, 13-H), 7.73 (d, J = 7.4 Hz, 2H 1-H), 7.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 6-H), 7.90 (d, J = 7.6 Hz, 2H, 14-H), 13.00 (s, br 1H, 16-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, DMSO): δ = 20.6 (5-C), 46.6 (9-C), 52.9 (2-C), 63.0 (3-C), 65.7 (8-C), 120.1 (11-C), 125.2 (12-C), 127.0 (13-C), 127.6 (14-C), 140.7 (15-C), 143.7 (10-C), 156.0 (7-C), 170.1 (4-C), 170.8 (1-C). **IR (KBr)**: 3383 (OH), 1749 (CO), 1670 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 179 (100) $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}]^+$, 370 (17) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 387 (22) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 392 (14) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 392.1097, berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NNaO}_6^+$: 392.1105. **R_f**: 0.11 (EE, + 1% HOAc).

5.22 2-((3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-7-acetyl-6-isopropyl-2,5-dioxo-1,4,7-triazonan-1-yl)essigsäuremethylester (221, TZD-193)

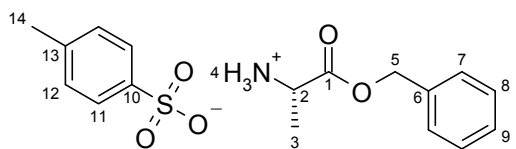


Das Amin **215** (47.1 mg, 118 μmol) wird in trockenem Acetonitril (5 mL) gelöst, mit Fmoc-Ser(Ac)-OH **220** (70.6 mg, 191 μmol) versetzt, dazu HATU (78.3 mg, 206 μmol) und DIPEA (50 μl , 294 μmol) gegeben und der Ansatz für 44 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt (EE/EtOH, 12:1). Anstatt dem erwarteten Kupplungsprodukt **217e** wird das acetylierte Produkt **221** (13.2 mg, 29.8 μmol) erhalten. Weiterhin kann verbliebenes Edukt **215** (25.1 mg, 62.6 μmol) reisoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 0.75, 0.93, 0.94, 1.01 (d, J = 6.6 Hz, 6H, 19-H, 20-H), 1.96, 2.30 (m, 1H, 18-H), 2.15, 2.23 (s, 3H, 22-H), 2.57, 2.64, 2.80, 3.09, 3.21, 3.25, 3.30-3.40, 3.46-3.54, 3.68 (m, 6H, 5-H, 23-H, 24-H), 3.04, 3.32, 3.53, 3.74 (d, J = 17.6 Hz, 2H, 2-H), 3.66, 3.83 (s, 3H, 25-H), 3.85 (d, J = 8.4 Hz, $\frac{1}{2}$ H, 17-H), 4.29, 4.35 (qs, 1H, 4-H), 4.62, (d, J = 10.6 Hz, $\frac{1}{2}$ H, 17-H), 6.38, 6.58 (s, 1H, 15-H), 7.10-7.15 (m, 1H, 12-H), 7.20 (q, J = 7.3 Hz, 1H, 11-H), 7.32-7.40 (m, 2H, 7-H, 10-H), 7.62, 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H, 13-H), 8.46, 8.52 (s, 1H, 8H). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeOD): δ = 18.8, 19.1, 19.6, 19.7 (19-C, 20-C), 21.2, 22.3 (22-C), 27.8, 28.0 (18-C), 30.5, 30.6 (5-C), 39.4, 40.7 (23-C), 44.5, 45.5 (24-C), 49.9 (2-C), 51.9, 52.3 (25-C), 55.8, 55.9 (4-C), 61.4, 67.2 (17-C), 108.6, 109.2 (6-C), 111.3 (10-C), 118.8, 119.1 (13-C), 119.9, 119.9 (12-C), 122.5, 122.7 (11-C), 126.9, 127.0 (7-C), 128.2, 128.7 (14-C), 136.1, 136.2 (9-C), 166.0, 166.1, 166.2, 170.6, 171.7, 172.0 (1-C, 3-C, 16-C, 21-C). **IR (KBr)**: 1650 (CO) 1741 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 443 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 465 (69) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 465.2108, berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{NaO}_5^+$ = 465.2108. **R_f**: 0.30 (EE/EtOH, 8:2).

5.23 (*S*)-2-Aminopropansäurebenzylester-*p*-tosylat (222, TZD-195)

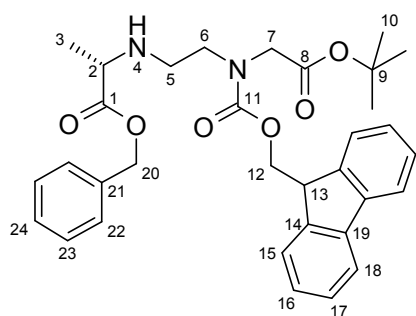
Alanin (10.00 g, 112 mmol) wird in Toluol (400 mL) suspendiert und mit Benzylalkohol (29 mL, 279 mmol) und *para*-Toluolsulfonsäure (21.26 g, 123 mmol) versetzt. Nach 20 h Erhitzen unter Rückfluss am Wasserabscheider wird die Lösung filtriert und Toluol am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird in Diethylether (250 mL) aufgenommen und die Suspension abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt und im HV getrocknet. Der Alaninester **222** (29.69 g, 85 mmol, 75 %) wird als schwachgelber Feststoff erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 1.54 (d, J = 7.6 Hz, 3H, 3-H), 2.37 (s, 3H, 14-H), 4.15 (q, J = 7.3, 1H, 2-H), 5.26 (d, J = 12.1 Hz, 1H, 5-H), 5.30 (d, J = 12.1 Hz, 1H, 5-H), 7.24 (d, J = 7.9 Hz, 2H, 12-H), 7.34-7.43 (m, 5H, 7-H, 8-H, 9-H), 7.73 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 11-H). **¹³C-NMR** (100 MHz,

MeOD): δ = 16.2 (3-C), 21.3 (14-C), 49.9 (2-C), 69.0 (5-C), 126.9 (11-C), 129.5, 129.7, 129.8 (7-C, 8-C, 9-C, 12-C), 136.5 (6-C), 141.7 (13-C), 143.5 (10-C), 170.8 (1-C). **IR (KBr)**: 1766 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 180 (100) $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_2]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 180.1015, berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_2]^+$ = 180.1019.

5.24 (S)-2-(2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-amino)ethylamino)-propansäurebenzylester (223, TZD-197)



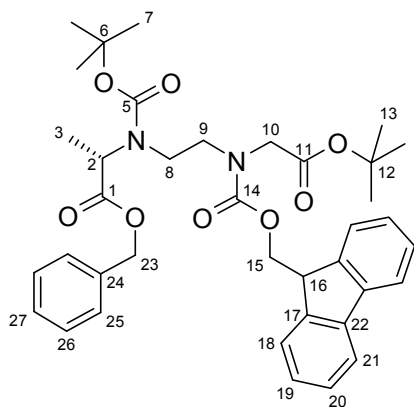
Das Rohprodukt des Aldehyds **206** (23.0 g, 58.1 mmol) wird in trockenem DMF (150 mL) gelöst. Dazu wird Alaninbenzylester-*p*-tosylat **222** (22.5 g, 63.9 mmol) und Natriumtriacetoxyborhydrid (14.3 g, 87.1 mmol) gegeben und die Mischung für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird Wasser (200 mL) hinzugegeben und mit Essigester (3x 250 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach

säulenchromatographischer Reinigung (DCM/Aceton, 15:1) wird in 66 % Ausbeute über 2 Stufen das Amin **223** (21.7 g, 38.8 mmol) als schwach gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.31, 1.36 (jeweils d, J = 7.0 Hz, 3H, 3-H), 1.47, 1.48 (jeweils s, 9H, 10-H), 2.52, 2.69, 2.78, 2.92 (jeweils m, 2H, 5-H), 3.31-3.58 (m, 3 H, 2-H, 6-H), 3.92-3.97 (m, 2H, 7-H), 4.22-4.52 (m, 3H, 12-H, 13-H), 5.14-5.21 (m, 2H, 20-H), 7.30-7.43 (m, 9H, 16-H, 17-H, 22-H, 23-H, 24-H), 7.59 (m, 2H, 15-H), 7.74-7.78 (m, 2H, 18-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl_3): δ = 18.4, 18.5 (3-C), 28.0 (10-C), 45.5, 45.8 (5-C), 47.2, 47.2 (13-C), 48.4, 48.8 (6-C), 50.4, 50.6 (7-C), 56.2, 56.3 (2-C), 66.5 (20-C), 67.5, 67.8 (12-C), 81.8, 82.0 (9-C), 119.8, 119.9, 124.9, 125.1, 127.0, 127.0, 127.6, 127.6, 128.1, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.5 (15-C, 16-C, 17-C, 18-C, 22-C, 23-C, 24-C), 135.6 (21-C), 141.2, 141.3 (14-C), 143.9, 143.9 (19-C), 156.1, 156.3 (11-C), 169.1 (8-C), 174.5, 174.8 (1-C). **IR (KBr)**: 1740 (CO), 1707 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 559 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 559.2796, berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_6^+$: 559.2803; m/z = 581.2631, berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{NaO}_6^+$: 581.2622. **R_f**: 0.42 (DCM/Aceton, 9:1).

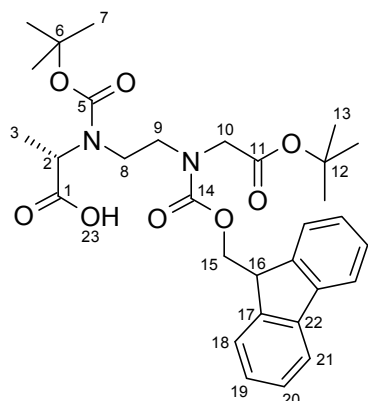
5.25 (S)-2-((2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-amino)ethyl)(tert-butoxycarbonyl)amino)propansäurebenzylester (224, TZD-199)

Das Amin **223** (17.0 g, 30.5 mmol) wird in THF (150 mL) gelöst und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (150 mL) versetzt. Anschließend wird portionsweise Boc-Anhydrid (10.8 g, 49.4 mmol) hinzugegeben und der Ansatz für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird Wasser (150 mL) zugesetzt und mit Essigester (3x 300 mL) extrahiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EE, 9:1) wird das Carbamat **224** (15.2 g, 23.0 mmol, 76 %) als farbloses Öl erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.28-1.55 (m, 21H, 3-H, 7-H, 13-H), 2.89-4.71 (m, 10H, 2-H, 8-H, 9-H, 10-H, 15-H, 16-H), 5.13-5.17 (m, 2H, 23-H), 7.28-7.43 (m, 9H, 19-H, 20-H, 25-H, 26-H, 27-H), 7.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 18-H), 7.69-7.80 (m, 2H, 21-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 15.3-16.0 (3-C), 27.4, 28.0, 28.0-28.3 (7-C, 13-C), 43.5, 44.7, 46.0, 46.8, 47.9, 47.3 (16-C, 8-C), 48.4-48.5 (9-C), 50.4-50.6 (10-C), 55.0, 55.6, 56.3, 56.7 (2-C), 66.5, 66.7, 67.7 (15-C, 23-C), 80.5, 80.6, 81.6, 81.7, 81.8, 81.9 (7-C, 13-C), 119.9 (118-C), 124.6, 124.9, 127.0, 127.1, 127.6, 128.0, 128.1, 128.1, 128.2, 128.4, 128.5 (19-C, 20-C, 21-C, 25-C, 26-C, 27-C), 135.6, 135.6 (24-C), 141.2 (22-C), 143.8 (17-C), 154.9-156.1 (5-C, 14-C), 168.6, 168.7 (11-C), 171.7, 171.9, 172.0 (1-C). **IR (KBr)**: 1700 (CO), 1746 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 559 (37) [M-CO₂-C₄H₈+H]⁺, 659 (100) [M+H]⁺, 676 (27) [M+NH₄]⁺, 681 (15) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 681.3144, berechnet für C₃₈H₄₆N₂NaO₈⁺: 681.3146. **R_f**: 0.11 (CH/EE, 9:1).

5.26 (S)-2-((2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-amino)ethyl)(*tert*-butoxycarbonyl)amino)propansäure (227, TZD-202)

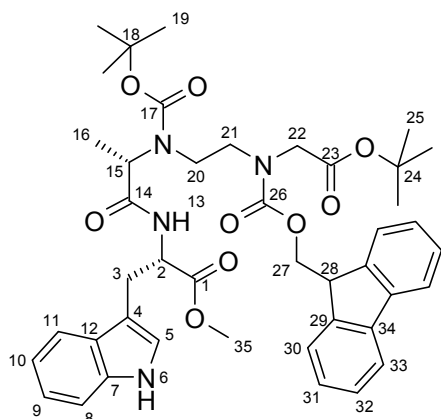


Der Benzylesters **224** (3.09 g, 4.69 mmol) wird in Ethanol (100 mL) gelöst und mit Pd(OH)₂/C (661 mg) versetzt. Danach wird die Mischung mit Argon entgast und anschließend 10 min Wasserstoff durch das Reaktionsgemisch geleitet. Nach 3 h Rühren unter Wasserstoffatmosphäre wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeengt. Die Säure **227** (2.56 g, 4.49 mmol, 96 %) wird als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.24-1.51 (m, 21H, 3-H, 7-H, 13-H), 2.80-5.10 (m, 10H, 2-H, 8-H, 9-H, 10-H, 15-H, 16-H), 7.26-7.78 (m, 8H, 18-H, 19-H, 20-H, 21-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 15.1-17.1 (3-C), 28.0-28.3 (7-C, 12-C), 43.5-46.8 (8-C), 47.2, 47.2 (16-C), 47.9, 49.1 (10-C), 50.1-50.5 (9-C), 53.0-55.5 (2-C), 67.0-68.0 (15-C), 80.7-82.1 (6-C, 12-C), 119.8 (18-C), 124.6, 125.0 (21-C), 127.0, 127.1 (19-C), 127.7 (20-C), 141.2 (22-C), 143.7 (17-C), 152.5-158.6 (5-C, 14-C), 167.6, 168.8, 169.8 (11-C), 175.1-176.0 (1-C). **IR (KBr)**: 1655 (CO), 1715 (CO), 1740 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: *m/z* (%) = 413 (38) [M-*t*Bu-Boc+H]⁺, 469 (52) [M-Boc+H]⁺, 569 (100) [M+H]⁺, 586 (18) [M+NH₄]⁺, 591 (12) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: *m/z* = 591.2679, berechnet für C₃₁H₄₀N₂NaO₈⁺: 591.2677. **R_f**: 0.35 (EE + 0.1 % HOAc).

5.27 (8S,11S)-11-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-4-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-7-(*tert*-butoxycarbonyl)-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-8-methyl-3,9-dioxo-2-oxa-4,7,10-triazadodecansäuremethylester (228, TZD-203)

Die Carbonsäure **227** (1.03 g, 1.81 mmol) wird in Dichlormethan (20 mL) gelöst und mit Tryptophanmethylester-Hydrochlorid **156** (605 mg, 2.38 mmol) und HATU 1.06 g (2.79 mmol) versetzt. Nach Zugabe von DIPEA 1.00 mL (5.88 mmol) wird der Ansatz für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird Wasser (20 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am

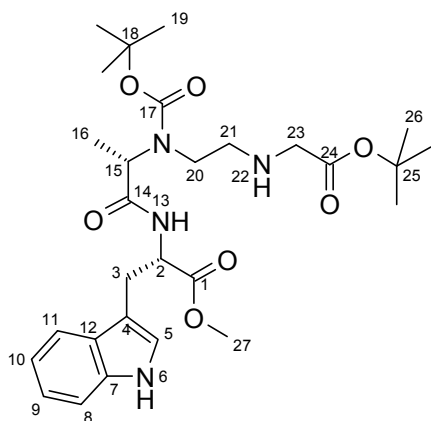


Rotationsverdampfer entfernt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie (CH/EE, 1:1) wird das Peptid **228** (1.11 g, 1.45 mmol, 80 %) als farblosen Schaum erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.20-1.55 (m, 21H, 16-H, 19-H, 25-H), 2.95-4.64 (m, 15H, 3-H, 15-H, 20-H, 21-H, 22-H, 27-H, 28-H, 35-H) 4.89 (m, 1H, 2-H), 6.62 (s, br, 1H, 13-H), 6.97-7.79 (m, 13H, 5-H, 8-H, 9-H, 10-H, 11-H, 30-H, 31-H, 32-H, 33-H), 8.44 (m, br 1H, 6-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 14.4, 14.8, 17.1 (16-C), 27.6, 27.7 (3-C), 26.8, 28.0, 28.1, 28.1, 28.1, 28.3 (19-C, 25-C), 36.6, 41.8, 43.8, 47.3, 47.8, 48.1, 49.1,

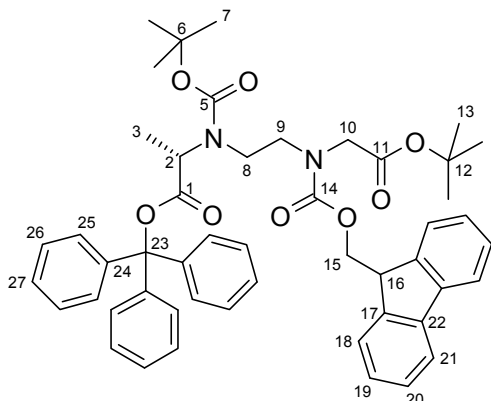
50.2, 50.4, 52.3, 52.3, 52.4, 52.9, 60.4 (2-C, 15-C, 20-C, 21-C, 22-C, 28-C, 35-C), 67.9 (27-C), 80.5, 80.6, 81.9, 82.0, 82.2 (18-C, 24-C), 109.8 (4-C), 111.2 (8-C), 118.4, 119.3, 119.4, 119.9, 120.0 (9-C, 10-C, 11-C, 30-C), 122.0 (5-C), 125.0, 125.0, 127.0, 127.1, 127.7, 127.7 (31-C, 32-C, 33-C, 12-C), 136.2 (7-C), 141.3 (34-C), 143.8, 143.9, (29-C), 155.8, 156.1 (17-C, 26-C), 167.7, 171.1, 172.3 (1-C, 14-C, 23-C). **IR (KBr)**: 1696 (CO), 1743 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 669 (5) [M-C₄H₈+H]⁺, 769 (100) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 791.8616, berechnet für C₄₃H₅₂N₄NaO₉⁺: 791.8627. **R_f**: 0.38 (CH/EE, 1:1).

5.28 (S)-2-((S)-2-((2-((tert-Butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)(tert-butoxycarbonyl)amino)propanamido)-3-(1H-indol-3-yl)propansäuremethylester (**229**, TZD-204)



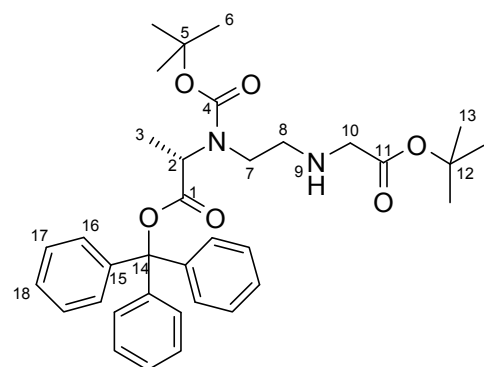
Das Carbamat **228** (1.08 g, 1.40 mmol) wird in DCM (20 mL) gelöst und mit Piperidin (1.4 mL 14.1 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 2 h wird Wasser (10 mL) hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchloridlösung (10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung wird das Amin **229** (401 mg, 73 μmol) in 52 % Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.40-1.47 (m, 21H, 16-H, 19-H, 26-H), 1.84 (s, br 1H, 22-H), 2.49-3.32, 3.76-3.89 (m, 9-H, 3-H, 15-H, 20-H, 21-H, 23-H), 3.63 (s, 3H, 27-H), 4.97 (m, 1H, 2-H), 7.05 (s, 1H, 5-H), 7.19 (ψt, J = 7.2 Hz, 1H, 10-H), 7.18 (ψt, J = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 7.35 (d, J = 8.1, 1H, 8-H), 7.57 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 11-H), 8.29 (s, 1H, 6-H), 9.10 (s, br, 1H, 13-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 15.2 (16-C), 26.9 (3-C), 28.1, 28.3, (19-C, 26-C), 45.3, 46.5 (br 20-C, 21-C), 52.0 (23-C), 53.0 (2-C), 60.4 (15-C), 80.7, 81.3 (18-C, 25-C), 110.7 (4-C), 111.1 (9-C), 118.7 (11-C), 119.5 (10-C), 122.1 (9-C), 122.8 (5-C), 127.6 (12-C), 136.0 (7-C), 171.1, 171.3, 172.2, 172.9 (1-C, 24-C). **IR (KBr)**: 1675 (CO), 1736 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 547 (100) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 547.3115, berechnet für C₂₈H₄₃N₄O₇: 547.3126; m/z = 569.2951, berechnet für C₂₈H₄₂N₄NaO₇: 569.2946. **R_f**: 0.3 (EE).

5.29 (S)-2-((2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-amino)ethyl)(*tert*-butoxycarbonyl)amino)propansäuretritylester (231, TZD-207)


Die Säure **227** (477 mg, 838 μmol) wird in trockenem Dichlormethan (10 mL) gelöst und mit DIPEA (600 μL , 3.53 mmol) und Tritylchlorid (425 mg, 1.44 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 3 h werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt, das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE, 9:1 + 0.2 % TEA). Der Ester **231** (495 mg, 610 μmol , 73 %) wird als farbloser Schaum erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.27-1.62 (m, 21H, 2-H, 7-H, 13-H), 2.93-4.78 (m, 10-H, 2-H, 8-H, 9-H, 10-H, 15-H, 16-H), 7.20-7.80 (m, 23H, 18-H, 19-H, 20-H, 21-H, 25-H, 26-H, 27H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 14.2, 15.2, 15.3, 16.0 (3-C), 26.8, 28.0, 28.2, 28.3, 28.4 (7-C, 13-C), 43.2, 43.5, 44.1 (8-C), 47.3 (16-C), 47.6, 47.8, 48.1, 48.5 (9-C), 49.1, 50.2, 50.3, 50.5 (10-C), 55.5, 55.9, 56.3 (2-C), 67.4, 67.9 (15-C), 80.5, 80.6, 80.6, 80.7, 81.8, 81.9, 82.0, 82.2 (6-C, 12-C), 90.7, 90.8 (23-C), 119.9 (18-C), 124.8, 124.9, 125.0, 125.1 (21-C), 127.0, 127.1, 127.1, 127.2, 127.3, 127.4, 127.4, 127.7, 127.8, 127.9, 127.9, 128.4 (19-C, 20-C, 25-C, 26-C, 27-C), 141.2, 141.3, 143.0, 143.0, 143.1, 143.8, 143.8, 143.9, 146.8 (17-C, 22-C, 24-C), 155.5, 155.6, 155.8, 156.1, 156.1 (5-C, 14-C), 168.5, 168.6, 168.6, 168.8, 169.7, 169.9, 170.0, 170.2 (1-C, 11-C). **IR (KBr)**: 1697 (CO), 1747 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 243 (100) $[\text{C}_{19}\text{H}_{15}]^+$, 828 (4) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 833 (6) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 833.3776, berechnet für $\text{C}_{50}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{NaO}_8^+$: 833.3772. **R_f**: 0.30 (CH/EE, 8:2 + 0.2 % TEA).

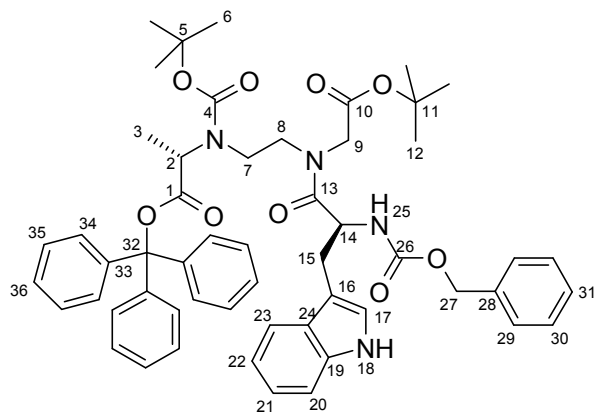
5.30 (S)-2-((2-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethylamino)ethyl)(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-propansäuretritylester (232, TZD-211)


Das Carbamat **231** (1.92 g, 2.37 mmol) wird in Dichlormethan gelöst (40 mL) und mit Piperidin (2.4 mL, 24.2 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 3 h werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt im HV getrocknet. Anschließend wird das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt, wobei zuerst mit CH/EE, 8:2 + 0.2 % TEA das Fmoc-Piperidin-Addukt abgetrennt wird und anschließend das Produkt mit EE + 0.2 % TEA von der Säule gespült wird. Das Amin **232** (1.12 g, 1.91 mmol) wird in 80 % Ausbeute als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.36-1.54 (m, 21H, 3-H, 6-H, 13-H), 2.66-2.80 (m, 2H, 8-H), 3.00-3.62 (m, 4H, 7-H, 10-H), 4.44-4.68 (m, 1H, 2-H), 7.21-7.34 (m, 9H, 17-H, 18-H), 7.34-7.44 (m, 6H, 16-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 14.2, 15.3, 16.2, 17.1 (3-C), 28.1, 28.1, 28.2, 28.3, 28.4 (6-C, 13-C), 46.0, 46.4 (7-C), 47.9, 48.6, 48.9, 49.1 (8-C), 51.5, 51.6, 51.6 (11-C), 56.0, 56.6 (2-C), 80.3, 80.4, 80.5, 80.5, 81.0, 81.1, 82.2, 82.7 (5-C, 12-C), 90.6, 90.6, 90.8 (14-C), 128.2, 127.3, 127.6, 127.8, 127.9, 128.3 (16-C, 17-C, 18-C), 143.0,

143.1 (15-C), 155.3, 155.6 (4-C), 169.6, 169.8, 170.1, 171.5 (1-C, 11-C). **IR (KBr)**: 1694 (CO), 1738 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 243 (100), 347 (14), 589 (11). **HR-ESI-MS**¹²: m/z = 347.2180, berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6^+$: 347.2177. **R_f**: 0.50 (EE + 0.2 % TEA).

5.31 (5*S*,11*S*)-5-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-7-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-10-(*tert*-butoxycarbonyl)-11-methyl-3,6-dioxo-1-phenyl-2-oxa-4,7,10-triazadodecansäurebenzylester (**233**, TZD-208)



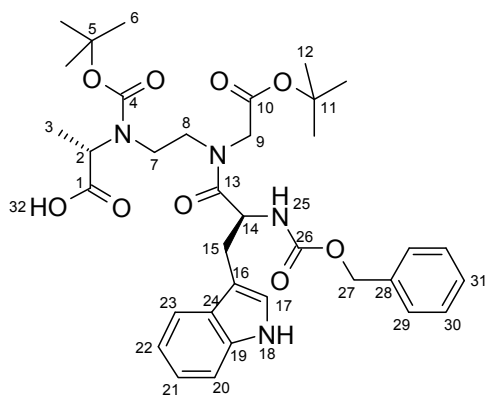
Das Amin **232** (1.10 g, 1.86 mmol) wird in Dichlormethan (30 mL) gelöst und mit DIPEA (1.6 mL, 9.41 mmol) gefolgt von Cbz-Trp-OH (1.31 g, 3.88 mmol) sowie BOP-Cl (983 mg, 3.86 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 18.5 h werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CH:EE 6:4 + 0.2% TEA) aufgereinigt. Das Peptid **233** (1.17 g, 1.29 mmol, 69 %) wird als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.25-1.55 (m, 21H, 3-H, 6-H, 12-H), 2.45-5.65 (m, 12H, 2-H, 7-H, 8-H, 9-H, 14-H, 15-H, 27-H), 6.87-7.98 (m, 26H, 17-H, 18-H, 20-H, 21-H, 22-H, 23-H, 25-H, 29-H, 30-H, 31-H, 34-H, 35-H, 36-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl_3): δ = 14.2, 15.2, 15.9, 16.0, 17.2 (3-C), 27.8, 27.9, 28.0, 28.1, 28.3, 28.3, 28.3, 28.4 (6-C, 12-C), 29.2, 29.3, 29.4, 29.6 (15-C), 42.4, 42.8, 43.0, 43.5 (7-C), 47.3, 47.6, 47.9, 48.0, 48.1, 49.1, 49.5 (8-C, 9-C), 50.7, 51.2, 51.4, 51.6 (14-C), 55.4, 55.6, 56.1, 56.5 (2-C), 66.6 (27-C), 80.5, 80.8, 80.9, 81.5, 81.7, 81.9, 82.1, 82.6, 82.7 (5-C, 11-C), 90.7, 90.8 (22-C), 110.0, 110.2 (16-C), 111.1, 111.2 (20-C), 118.6, 118.6 (23-C), 119.5, 119.6 (22-C), 122.0, 122.1 (21-C), 123.0, 123.0, 123.3, 123.5 (17-C), 127.2, 127.3, 127.3, 127.4, 127.4, 127.7, 127.8, 127.8, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.4 (24-C, 29-C, 30-C, 31-C, 34-C, 35-C, 36-C), 135.8, 135.8, 136.0, 136.3 (19-C, 28-C), 142.9, 143.1 (33-C), 154.9, 155.2, 155.4, 155.5, 155.6 (4-C, 26-C), 167.7, 167.8, 168.0, 169.0, 169.8, 170.2, 170.4, 171.1, 172.4, 172.5, 172.6 (1-C, 10-C, 13-C). **IR (KBr)**: 1650 (CO), 1698 (CO), 1742 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 243 (100) $[\text{C}_{19}\text{H}_{15}]^+$, 931 (8) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 931.4248, berechnet für $\text{C}_{54}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{NaO}_9^+$: 931.4253. **R_f**: 0.38 (CH/EE, 6:4 + 0.2 % TEA).

5.32 (S)-2-((2-((S)-N-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)-2-(benzyloxycarbonylamino)-2-(1*H*-indol-3-ylpropanamido)ethyl)(*tert*-butoxycarbonyl)amino)propansäure (**234**, TZD-209)

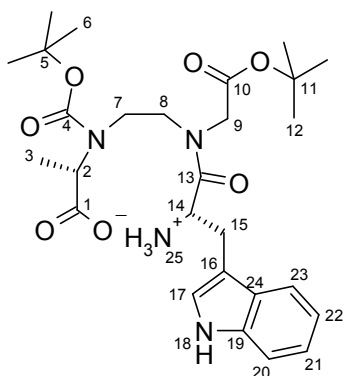
Der Ester **233** 1.13 g, 1.25 mmol) wird in Ethanol (25 mL) gelöst und 20.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abtrennen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum, säulenchromatographischer Reinigung (CH:EE, 1:1 + 0.1 % HOAc) sowie Trocknen im Hochvakuum wird die Säure **234** (770 mg, 1.16 mmol, 93 %) als farbloser Schaum erhalten.

¹² Aufgrund der Instabilität der Trityl-Schutzgruppe konnte im HR-MS-Spektrum nur das Produkt nach Abspaltung der Schutzgruppe beobachtet werden.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.20-1.50 (m, 21H, 3-H, 6-H, 12-H), 2.65-5.11 (m, 12H, 2-H, 7-H, 8-H, 9-H, 14-H, 15-H, 27-H), 5.88-6.00 (m, 1H, 25-H), 7.00-7.69 (m, 10H, 17-H, 20-H, 21-H, 22-H, 23-H, 29-H, 30-H, 31-H), 8.35, 8.46, 8.61 (s, 1H, 18-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 14.2, 15.2, 15.7, 17.2 (3-C), 27.9, 28.0, 28.2, 28.3, 28.3 (6-C, 12-C), 28.9, 29.5 (15-C), 43.1, 44.5, (7-C), 47.0, 47.3, 47.6, 47.9, (8-C), 49.3, 49.8, 51.1, 51.3 (9-C), 51.5, 51.7, 53.4 (14-C), 54.5, 55.1, 55.8, 56.3, 58.5 (2-C), 66.9 (27-C), 81.0, 81.1, 81.7, 81.9, 82.2, 82.9 (5-C, 11-C), 109.9, 110.0 (16-C), 111.3, 111.4 (20-C), 118.5, 118.6 (23-C), 119.5 (22-C), 122.0 (21-C), 123.3, 123.7 (17-C), 127.4, 127.5, 127.9, 127.9, 128.0, 128.0, 128.4, 128.4, (24-C, 29-C, 30-C, 31-C), 136.1, 136.2 (19-C, 26-C), 155.1, 156.0, 156.1, 156.2 (4-C, 26-C), 167.8, 168.0, 168.2, 169.0, 172.8, 172.9, 173.0 (1-C, 10-C, 13-C). **IR (KBr)**: 1647 (CO), 1699 (CO), 1740 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 667 (100) [M+H]⁺, 689 (12) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 689.3167, berechnet für C₃₅H₄₆N₆NaO₉⁺: 689.3157. **R_f**: 0.55 (EE + 0.1 % HOAc).

5.33 (S)-2-((2-((S)-2-amino-N-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-3-(1H-indol-3-yl)propan-amido)ethyl)(tert-butoxycarbonyl)amino)propansäure (235, TZD-210)

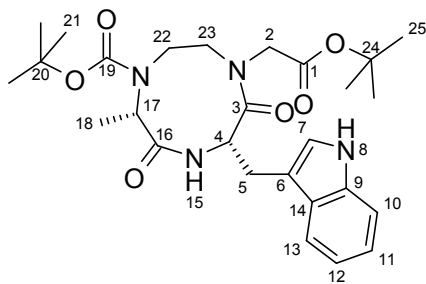


Das Carbamat **234** (1.00 g, 1.50 mmol) wird in Ethanol (150 mL) gelöst und mit Pd(OH)₂/C (309 mg) versetzt. Anschließend wird das Gemisch mit Argon entgast, danach für 10 min Wasserstoff durch das Reaktionsgemisch geleitet und die Reaktion für 1 h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Filtration wird das partiell entschützte Peptid **235** (794 mg, 1.49 mmol, 99 %) als farblosen Schaum erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, MeCN): δ = 1.18-1.40 (m, 21H, 3-H, 6-H, 12-H), 2.60-4.80 (m, 10H, 2-H, 7-H, 8-H, 9-H, 14-H, 15-H), 5.92 (s, br, 3H, 25-H), 7.00-7.67 (m, 5H, 17-H, 20-H, 21-H, 22-H, 24-H), 9.58-9.82 (m, 1H, 18H). **¹³C-NMR** (150 MHz, MeCN): δ = 15.3, 15.8 (3-C), 28.2, 28.3, 28.4, 28.5, 30.3, 31.0, 31.2, 31.4 (6-C, 12-C, 15-C), 43.4, 44.5, 46.0, 46.5 (7-C, 8-C), 50.1, 50.2, 50.3, 56.4, 57.1, 57.7, 58.0, 58.8 (2-C, 9-C, 14-C), 80.8, 81.1, 81.5, 82.6 (5-C, 11-C), 109.3, 109.4 (16-C), 112.4 (20-C), 119.6, 119.7 (23-C), 120.0 (22-C), 122.6 (21-C), 125.8 (17-C), 128.4 (24-C), 137.3 (19-C), 155.0 (4-C), 166.7, 166.8, 167.0, 167.9, 168.3, 169.0 (10-C, 13-C), 173.3, 174.1, 174.7 (1-C). **IR (KBr)**: 1669 (CO), 1740 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 533 (100) [M+H]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 533.2976, berechnet für C₂₇H₄₁N₄O₇⁺: 533.2970. m/z = 555.2788, berechnet für C₂₇H₄₀N₄NaO₇⁺: 555.2789. **R_f**: 0.57 (EtOH).

5.34 (2S,5S)-5-((1H-Indol-3-yl)methyl)-7-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-2-methyl-3,6-dioxo-1,4,7-triazonane-1-carbonsäure-tert-butylester (230, TZD-213)

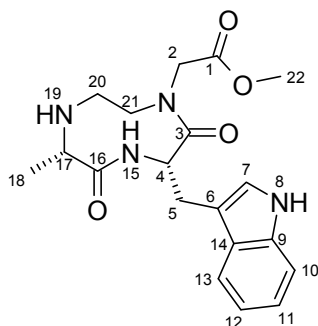
Das Peptid **235** (794 mg, 1.49 mmol) und HATU (1.44 g, 3.79 mmol) wird in DCM (800 mL) vorgelegt. Bei 0 °C wird langsam DIPEA (800 µl) hinzugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 21.5 h wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE, 3:7). Der 9-gliedrige Makrocyclus **230** (479 mg, 930 µmol, 63 %) wird als bräunliches zähflüssiges Öl erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1.14 (d, J = 6.8 Hz, 3H, 18-H), 1.30, 1.39 (s, 18H, 21-H, 25-H), 2.85 (m, 1H, 22-H), 2.93-3.05 (m, 2H, 5-H), 3.20 (m, 1H, 23-H), 3.55 (d, J = 17.3 Hz, 1H, 2-H), 3.89 (m, 1H, 22-H), 4.08 (d, J = 6.7 Hz, 1H, 17-H), 4.17 (m, 1H, 23-H), 4.38 (d, J = 17.3 Hz, 1H, 2-H), 4.75 (m, 1H, 4-H), 6.99 (ψ t, J = 7.4 Hz, 1H, 12-H), 7.07 (ψ t, J = 7.5 Hz, 1H, 11-H), 7.28, (s, 1H, 7-H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 10-H), 7.38 (d, J = 6.3 Hz, 1H, 15-H), 7.51 (d, J = 7.1 Hz,

1H, 13-H), 10.83 (s, 1H, 8-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO): δ = 14.3 (18-C), 27.7, 27.9 (21-C, 25-C), 28.6 (5-C), 43.0 (22-C), 45.5 (23-C), 48.4 (2-C), 49.8 (4-C), 53.6 (17-C), 80.0, 80.3 (20-C, 24-C), 109.5 (6-C), 111.3 (10-C), 117.7 (13-C), 118.3 (12-C), 120.7 (11-C), 123.9 (7-C), 127.2 (14-C), 135.9 (9-C), 154.6 (19-C), 168.5, 171.4, 173.3 (1-C, 13-C, 16-C). **IR (KBr)**: 1651 (CO), 1688 (CO), 1740 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 403 (89) $[\text{M}-2\text{x}\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$, 415 (4) $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$, 459 (100) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$, 515 (35) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 532 (4) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 537 (16) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: m/z = 537.2684, berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{NaO}_6^+$: 537.2684. **R_f**: 0.38 (EE).

5.35 2-((3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl-6-methyl-2,5-dioxo-1,4,7-triazonan-1-yl)-essigsäuremethylester (236, TZD-214)



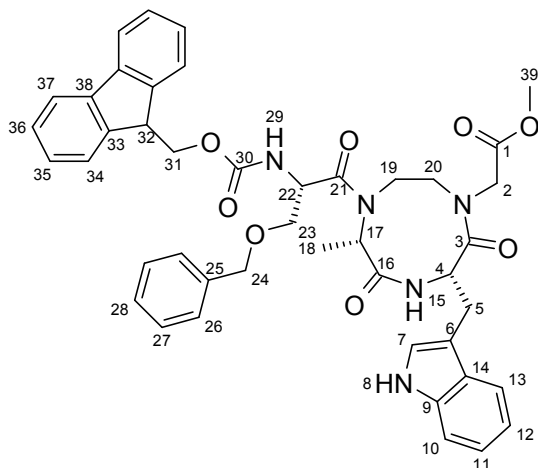
Der Makrocyclus **230** (297 mg, 578 μmol) wird in DCM (10 mL) gelöst, mit TES (920 μl , 5.76 mmol) versetzt, das Gemisch auf 0 °C gekühlt und TFA (2 mL, 26 mmol) hinzugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 2 h werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand am Hochvakuum für eine Stunde getrocknet. Nach Lösen des Rückstandes in MeOH (20 mL) wird bei 0 °C Thionylchlorid (400 μl , 5.51 mmol) hinzugegeben und der Ansatz für 26.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei 0 °C erneut Thionylchlorid (400 μl , 5.51 mmol) hinzugegeben und weitere 23 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Kühlen des Gemisches auf 0 °C wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (40 mL) hinzugegeben und mit Dichlormethan (3x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/EtOH, 7:3) wird der Makrocyclus **236** (106 mg, 283 μmol , 49 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeCN): δ = 1.15 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 18-H), 2.39 (ddd, J = 6.4 Hz, J = 6.4 Hz, J = 12.1 Hz, 1H, 20-H), 2.55 (ddd, J = 6.1 Hz, J = 6.1 Hz, J = 12.2 Hz, 1H, 20-H), 3.05 (d, J = 16.7 Hz, 1H, 2-H), 3.08 (ddd, J = 6.4 Hz, J = 6.6 Hz, J = 13.0 Hz, 1H, 21-H), 3.16 (ddd, J = 0.5 Hz, J = 4.5 Hz, J = 14.6 Hz, 1H, 5-H), 3.17 (q, J = 6.9 Hz, 1H, 17-H), 3.22 (ddd, J = 6.3 Hz, J = 6.3 Hz, J = 13.7 Hz, 1H, 21-H), 3.34 (dd, J = 5.1 Hz, J = 14.5 Hz, 1H, 5-H), 3.52 (d, J = 17.2 Hz, 1H, 2-H), 3.67 (s, 3H, 22-H), 4.21 (dd, J = 4.7 Hz, J = 7.8 Hz, 1H, 4-H), 6.54 (s, br 1H, 15-H), 7.06 (ddd, J = 7.9 Hz, J = 7.0 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, 12-H), 7.11 (d, J = 2.4 Hz, 1H, 7-H), 7.15 (ddd, J = 1.1 Hz, J = 7.0 Hz, J = 8.1 Hz, 1H, 11-H), 7.42 (ddd, J = 8.1 Hz, J = 0.8 Hz, J = 0.8 Hz, 1H, 10-H), 7.56 (dd, J = 0.8 Hz, J = 7.9 Hz, 1H, 13-H), 9.26 (s, 1H, 8-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeCN): δ = 19.2 (18-C), 31.0 (15-C), 45.4 (20-C), 47.0 (21-C), 50.9 (2-C), 52.1 (22-C), 56.9 (18), 57.1 (4-C), 109.7 (6-C), 112.2 (10-C), 119.7 (13-C), 120.0 (12-H), 122.6 (11-H), 125.6 (7-C), 128.6 (14-C), 137.4 (9-C), 166.4, 167.2, 176.7 (1-C, 3-C, 16-C). **IR (KBr)**: 1667 (CO), 1745 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 373 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**:

$m/z = 373.1876$, berechnet für $C_{19}H_{25}N_4O_4^+$: 373.1870; $m/z = 395.1691$, berechnet für $C_{19}H_{24}N_4NaO_4^+$: 395.1690. **R_f**: 0.35 (EE/EtOH, 1:1).

5.36 2-((3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-7-((*S*)-2-((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)-carbonylamino)-3-(benzyloxy)propanoyl)-6-methyl-2,5-dioxo-1,4,7-triazonan-1-yl)essigsäuremethylester (242c**, **TZD-222**)**

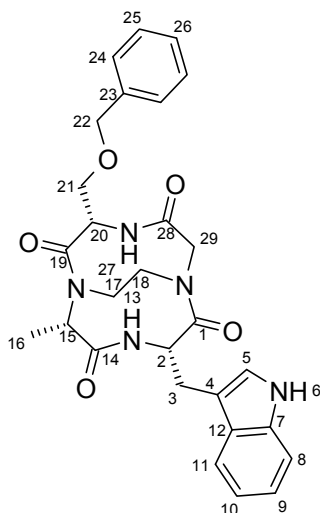


Der Cyclus **236** (160 mg, 430 μ mol) wird in DMF (10 mL) gelöst und mit Fmoc-Ser(Bn)-OH (351 mg, 841 μ mol), HATU (378 mg, 994 μ mol) und DIPEA (230 μ l, 1.35 mmol) versetzt. Nach Erwärmen auf 40 °C für 66.5 h wird erneut Fmoc-Ser(Bn)-OH (141 mg, 338 μ mol), HATU (119 mg, 313 μ mol) und DIPEA (100 μ l, 588 μ mol) hinzugefügt. Nach weiteren 75.5 h Reaktionszeit wird wiederum Fmoc-Ser(Bn)-OH (386 mg, 925 μ mol), HATU (324 mg, 852 μ mol) und DIPEA (150 μ l, 882 μ mol) zur Reaktionsmischung gegeben. Nach weiteren 22 h wird abermals Fmoc-Ser(Bn)-OH (198 mg, 474 μ mol), HATU (167 mg, 439 μ mol) und

DIPEA (80 μ l, 470 μ mol) zugegeben und erneut 98 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (30 mL) hinzugegeben und mit Dichlormethan (4x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach intensivem Trocknen im Hochvakuum zum Entfernen von DMF wird das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (DCM/Aceton, 7:3). Dadurch wird der acylierte Makrocyclus **242c** (134 mg, 173 μ mol) in 40 % Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten.

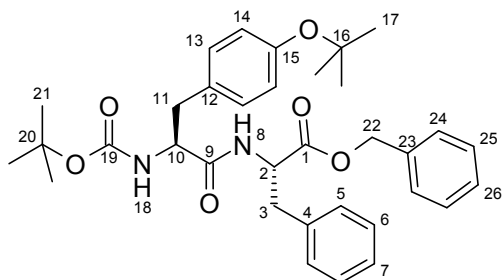
¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.37, 1.49$ (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 18-H), 2.85-3.82 (m, 13H, 2-H, 5-H, 19-H, 20-H, 23-H, 39-H), 4.18-4.42 (m, 4.5H, 17-H, 4-H, 31-H, 32-H), 4.49-4.59 (m, 2H, 24-H), 4.73-4.87 (m, 2.5H, 17-H, 22-H), 5.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 0.5H, 29-H), 5.80 (d, $J = 7.7$ Hz, 0.5H, 29-H), 6.26, 6.41 (s, 1H, 15-H), 7.01, 7.05 (s, 1H, 7-H), 7.08-7.22 (m, 2H, 11-H, 12-H), 7.25-7.43 (m, 10H, 10-H, 26-H, 27-H, 28-H, 35-H, 36-H), 7.56-7.63 (m, 3H, 13-H, 34-H), 7.76-7.79 (m, 2H, 37-H), 8.21, 8.34 (8-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 14.5, 15.5$ (18-C), 30.6, 30.7 (5-C), 40.6, 42.7, 44.9, 46.2 (19-C, 20-C), 47.1, 47.1 (32-C), 50.1, 50.2 (2-C), 50.6, 50.7 (22-C), 52.3, 52.7 (39-C), 55.2, 55.5, 55.7, 55.9 (17-C, 4-C), 67.1, 67.2 (31-C), 70.7, 70.9 (23-C), 73.4, 73.7 (24-C), 108.9, 109.0 (6-C), 111.3, 111.3 (10-C), 118.8, 119.0 (13-C), 120.0 (12-C, 34-C), 122.6, 122.6 (11-C), 124.1, 124.2 (7-C), 125.1, 125.1 (37-C), 126.9, 126.9, 127.1, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.5, 128.5 (14-C, 26-C, 27-C, 28-C, 35-C, 36-C), 136.1, 136.2, 137.2, 137.6 (9-C, 25-C), 141.2, 143.7, 143.8 (33-C, 38-C), 155.4, 155.9 (30-C), 165.5, 165.9, 166.1, 166.3, 171.0, 171.3, 171.4 (1-C, 3-C, 16-C, 21-C). **IR (KBr)**: 1654 (CO), 1735 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 772 (91) $[M+H]^+$, 780 (199) $[M+NH_4]^+$, 794 (56) $[M+Na]^+$. **HR-ESI-MS**: $m/z = 794.3172$, berechnet für $C_{44}H_{45}N_5NaO_8^+$: 794.3160. **R_f**: 0.58 (EE/EtOH, 9:1).

¹³ *cis/trans*-Isomerengemisch (1:1)

5.37 (3*S*,6*S*,9*S*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-9-((benzyloxy)methyl)-6-methyl-1,4,7,10-tetraazabicyclo-[5.5.2]tetradecane-2,5,8,11-tetraon (243, TZD-229)


Das Carbamat **242c** (145 mg, 187 μmol) wird in DMF (10 mL) gelöst, Piperidin (200 μl , 2.02 mmol) hinzugegeben und der Ansatz für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (15 mL) hinzugegeben, das Gemisch mit Dichlormethan (4x 15 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen und Trocknen im Hochvakuum wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 10:1) aufgereinigt. Das C₂-verbrückte Cyclotetrapeptid **243** (72.5 mg, 140 μmol , 75 %) wird als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.41 (d, J = 6.7 Hz, 1H, 16-H), 2.65-2.80 (m, 3H, 17-H, 18-H, 29-H), 3.12 (ψd , J = 11.8 Hz, 1H, 3-H), 3.36 (ψd , J = 10.6 Hz, 1H, 3-H), 3.45-3.60 (m, 4-H, 17-H, 18-H, 21-H, 29-H), 3.72 (ψd , J = 5.4 Hz, 1H, 21-H), 3.93 (d, J = 6.9 Hz, 1H, 15-H), 3.99 (ψs , 1H, 20-H), 4.20 (ψs , 1H, 2-H), 4.45 (s, 2H, 22-H), 7.01 (s, 1H, 5-H), 7.02 (ψt , J = 7.5 Hz, 1H, 10-H), 7.10 (ψt , J = 7.3 Hz, 1H, 9-H), 7.20-7.32 (m, 6H, 8-H, 24-H, 25-H, 26-H), 7.45 (s, 1H, 27-H), 7.50 (s, 1H, 13-H), 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 11-H), 9.27 (1H, 6-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 19.1 (16-C), 30.4 (3-C), 40.7, 43.1, 49.6 (17-C, 18-C, 29-C), 55.7 (2-C), 56.1 (20-C), 56.2 (15-C), 71.2 (21), 73.4 (22-C), 108.3 (4-C), 111.4 (8-C), 118.7 (11-C), 119.4 (10-C), 122.1 (9-C), 124.9 (5-C), 127.0 (12-C), 127.8, 127.9, 128.4 (24-C, 25-C, 26-C), 136.1 (7-C), 137.1 (23-C), 164.7, 166.7, 166.9, 169.2 (1-C, 14-C, 19-C, 28-C). **IR (KBr)**: 1655 (CO) cm⁻¹. **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 518 (100) [M+H]⁺, 540 (15) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: m/z = 540.2223, berechnet für C₄₄H₄₅N₅NaO₈⁺: 540.2217. **R_f**: 0.06 (DCM/MeOH, 12:1).

5.38 (S)-2-((S)-2-(tert-Butoxycarbonylamino)-3-(4-tert-butoxyphenyl)propan-amido)-3-phenylpropan-säurebenzylester (238, TZD-225)


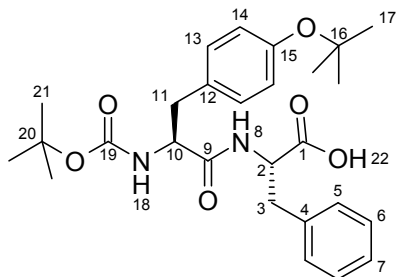
Boc-Tyr(*t*Bu)-OH (2.00 g, 5.95 mmol) und H-Phe-OBn*HCl (1.80 g, 6.17 mmol) wird in Acetonitril (50 mL) gelöst. Bei 0 °C wird portionsweise HATU (2.59 g, 6.81 mmol) hinzugegeben und anschließend das Gemisch mit TEA (1.8 mL, 12.95 mmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wird gesättigte Natriumchloridlösung (50 mL) hinzugegeben und das Gemisch mit DCM (1x 100 mL, 2x 50 mL) extrahiert.

Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung (DCM/Aceton, 9:1) wird das Dipeptid **238** (3.04 g, 5.29 mmol, 89 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.34 (s, 9H, 21-H), 1.41 (s, 9H, 17-H), 2.96-3.11 (m, 4H, 3-H, 11-H), 4.31 (m, 1-H, 2-H), 4.84 (ψq , J = 6.5 Hz, 1H, 10-H), 4.99 (s, br, 1-H, 8-H), 5.11 (s, 2H, 22-H), 6.37 (d, J = 7.4 Hz, 1H, 18-C), 6.91 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 14-H), 6.96 (m, 2H, 5-H), 7.08 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 13-H), 7.18-7.23 (m, 3H, 6-H, 7-H), 7.27-7.30 (m, 2H, 24-H), 7.35-7.40 (m, 3H, 25-H, 26-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 28.2, 28.7

(17-C, 21-C), 37.6, 37.9 (3-C, 11-C); 53.2; 55.7 (2-C, 10-C); 67.1 (22-C); 78.2 (20-C), 80.0 (br, 16-C), 124.1 (14-C), 126.9, 128.4, 128.5, 129.2, (5-C, 6-C, 7-C, 24-C, 25-C, 26-C), 129.7 (13-C), 131.2, 134.9, 135.4 (4-C, 12-C, 23-C), 154.3, 155.2 (15-C, 19-C), 170.7, 170.8 (1-C, 9-C). **IR (KBr):** 1667 (CO), 1681 (CO), 1736 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 475 (18) $[\text{M-Boc+H}]^+$, 519 (49) $[\text{M-C}_4\text{H}_8\text{+H}]^+$, 575 (100) $[\text{M+H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 597.2924, berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{NaO}_6^+$: 597.2935. **R_f:** 0.37 (CH/EE; 7:3).

5.39 (S)-2-((S)-2-(tert-Butoxycarbonylamino)-3-(4-tert-butoxyphenyl)propanamido)-3-phenylpropan-säure (239, TZD-226)

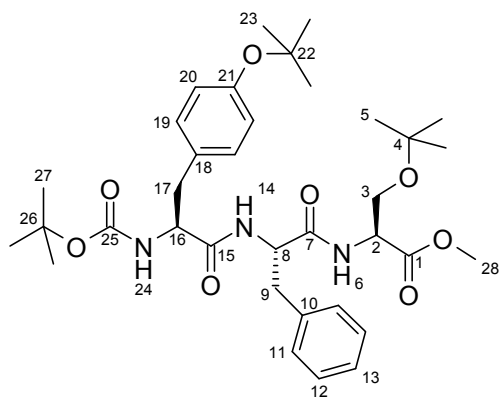


Der Dipeptidester **238** (2.97 g, 5.17 mmol) wird in Ethanol (150 mL) gelöst und mit Pd/C (310 mg, 10 %) versetzt. Anschließend wird jeweils 10 Minuten Argon und Wasserstoff durch die Reaktionsmischung geleitet und der Ansatz für 6 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Filtration, Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Trocknen im Hochvakuum wird in quantitativer Ausbeute die Dipeptidsäure **239** (2.51 g, 5.17 mmol) als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeCN): δ = 1.32 (s, 9H, 17-H), 1.39 (s, 9H, 21-H), 2.91 (m, 1H, 11-H), 3.00 (m, 2H, 3-H, 11-H), 3.16 (dd, J = 4.7 Hz, J = 13.4 Hz, 1H, 3-H), 4.44 (m, 1H, 10-H), 4.78 (m, 1H, 2-H), 5.22 (s, br, 1H, 18-H), 6.75 (d, J = 5.9 Hz, 1H, 8-H), 6.90 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 14-H), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 13-H), 7.11 (d, J = 6.8 Hz, 2H, 5-H), 7.19-7.28 (m, 3H, 6-H, 7-H), 8.94 (s, br, 1H, 22-H). **¹³C-NMR** (100 MHz, MeCN): δ = 28.2 (21-C), 28.7 (17-C), 37.5 (3-C), 37.6 (11-C), 53.3 (2-C), 55.6 (10-C), 78.4, 80.3 (16-C, 20-C), 124.2 (14-C), 127.0 (7-C), 128.4 (6-C), 129.4 (5-C), 129.7 (13-C), 131.4 (12-C), 135.9 (4-C), 154.0, 155.6 (15-C, 19-C), 171.4, 173.6 (1-C, 9-C). **IR (KBr):** 1659 (CO), 1720 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS:** m/z (%) = 385 (47) $[\text{M-Boc+H}]^+$; 429 (100) $[\text{M-}t\text{Bu+H}]^+$, 485 (58) $[\text{M+H}]^+$. **HR-ESI-MS:** m/z = 507.2476, berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{NaO}_6^+$: 507.2466. **R_f:** 0.25 (EE + 0.1 % HOAc).

5.40 (6S,9S,12S)-Methyl-9-benzyl-6-(4-(tert-butoxy)benzyl)-12-(tert-butoxy-methyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-olat (240, TZD-237)

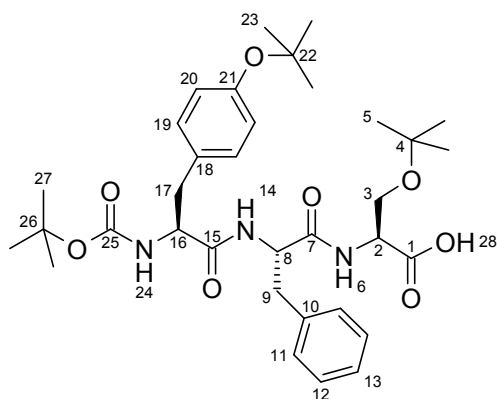
Die Dipeptidsäure **239** (1.91 g, 3.95 mmol), Ser(*t*Bu)-OMe*HCl (933 mg, 4.41 mmol) und HATU (1.66 g, 4.38 mmol) wird in Acetonitril (50 mL) gelöst und bei 0 °C mit DIPEA (2.2 mL, 12.6 mmol) versetzt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wird Wasser (50 mL) hinzugegeben und mit Salzsäure (1 M) auf pH 3 angesäuert. Anschließend wird mit DCM (1x 100 mL, 2x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE) wird der Tripeptidester **240** (2.47 g, 3.85 mmol, 97 %) als farbloser Schaum erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.11 (s, 9H, 5-H), 1.34 (s, 9H, 23-H), 1.40 (s, 9H, 27-H), 2.91-3.10 (m, 4H, 9-H, 17-H), 3.50 (dd, J = 3.4 Hz, J = 9.1 Hz, 1H, 3-H), 3.74 (s, 3H, 28-H), 3.76 (dd, J = 3.1 Hz, J = 9.1 Hz, 1H, 3-H), 4.34 (ψ s, br, 1H, 16-H), 4.61 (m, 1H, 2-H), 4.66 (ψ q, J = 6.8 Hz, 1H, 8-H), 4.88 (s, br, 24-H), 6.40 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 6-H), 6.62 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 14-H), 6.92 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 20-H), 7.08 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 19-H), 7.20-7.25 (m, 3H, 11H, 13H), 7.29 (m, 2H, 12-H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3): δ = 27.2 (5-C), 28.2 (27-C), 28.8 (23-C), 37.4 (br, 17-C), 38.5 (9-C),

52.2 (28-C), 53.0 (2-C), 54.2 (8-C), 55.7 (br, 16-C), 61.6 (3-C), 73.4, 78.3, 80.2 (br, 4-C, 22-C, 26-C), 124.2 (20-C), 127.0 (13-C), 128.6 (12-C), 129.4 (11-C), 129.7 (19-C), 131.2 (18-C), 136.3 (10-C), 154.4, 155.3 (br, 21-C, 25-C), 170.1, 170.3, 171.0 (1-C, 7-C, 15-C). **IR (KBr)**: 1648 (CO), 1694 (CO), 1749 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 642 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: 664.3546, berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{NaO}_8$: 664.3568. **R_f**: 0.59 (CH/EE, 1:1).

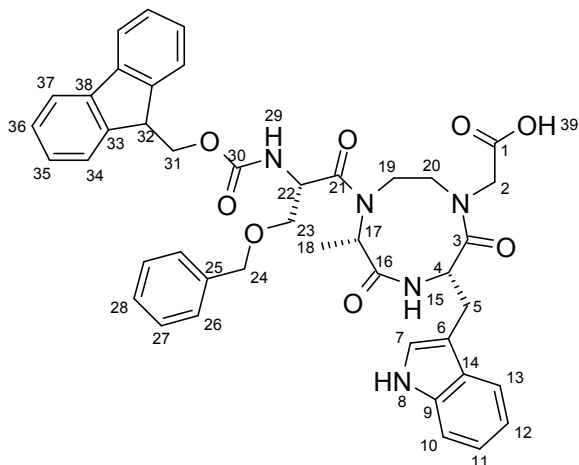
5.41 (6*S*,9*S*,12*S*)-9-Benzyl-6-(4-(*tert*-butoxy)benzyl)-12-(*tert*-butoxymethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triaza-13-tridecansäure (241, TZD-238)



Der Tripeptidester **240** (2.31 g, 3.61 mmol) wird in THF (115 mL) gelöst. Dazu wird bei 0 °C LiOH (247.0 mg, 10.3 mmol) gelöst in 60 mL Wasser gegeben und der Ansatz für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit Salzsäure (1M) auf pH 3 angesäuert und mit DCM (3x, 50 mL) extrahiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE + 0.1 % HOAc) wird in quantitativer Ausbeute die Peptidsäure **241** (2.23 g, 3.61 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.16 (s, 9H, 5-H), 1.33 (s, 9H, 23-H), 1.39 (s, 9H, 27-H), 2.89-3.11 (m, 4H, 9-H, 17-H), 3.56 (dd, J = 4.6 Hz, J = 9.1 Hz, 1H, 3-H), 3.82 (dd, J = 8.7 Hz, J = 3.0 Hz, 1H, 3-H), 4.41 (ψ s, br, 1H, 16-H), 4.58 (m, 1H, 2-H), 4.71 (ψ q, 1H, 8-H), 5.03 (s, br, 1H, 24-H), 6.66 (s, br, 1H, 6-H), 6.91 (d, J = 8.6 Hz, 1H, 20-H), 6.99 (s, br, 14-H), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 19-H), 7.19-7.23 (m, 3H, 11-H, 13-H), 7.27 (ψ t, J = 7.1 Hz, 2H, 12-H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3): δ = 27.3 (5-C), 28.2 (27-C), 28.8 (23-C), 37.9 (17-C), 38.5 (9-C), 53.0 (8-C), 54.4 (2-C), 55.6 (16-C), 61.9 (3-C), 74.1, 78.4, 80.3 (4-C, 22-C, 26-C), 124.2 (20-C), 127.0 (13-C), 128.6 (12-C), 129.4 (11-C), 129.7 (19-C), 131.2 (18-C), 136.2 (10-C), 154.3 (21-C), 155.5 (25-C), 170.6, 171.4, 172.4 (1-C, 7-C, 15-C). **IR (KBr)**: 1649 (CO), 1691 (CO), 1721 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 628 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HR-ESI-MS**: 650.3413, berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{NaO}_8$: 650.3412. **R_f**: 0.20 (EE + 0.1% HOAc).

5.42 (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl ((*S*)-1-((2*S*,5*S*)-5-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-7-(2-((2,4-dimethoxybenzyl)amino)-2-oxoethyl)-2-methyl-3,6-dioxo-1,4,7-triazonan-1-yl)-3-(benzyloxy)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (245**, TZD-241)**

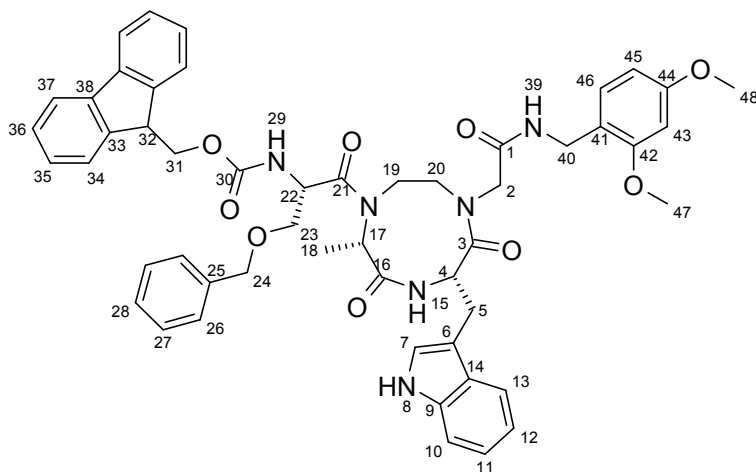


a) Der Methylester **242c** (112 mg, 146 μmol) wird in 1,2-Dichlorethan (6 mL) gelöst und mit Trimethylzinnhydroxid (253 mg, 1.40 mmol) versetzt. Nach Rühren unter Rückfluss für 4 Tage wird Trimethylzinnhydroxid (200 mg, 1.11 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 3 Tage erhitzt. Anschließend wird gesättigte Natriumhydrogensulfatlösung (10 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/EtOH, 9:1 + 0.1 % HOAc) wird die Carbonsäure **245** (33.2 mg, 43 μmol , 30 %) als farbloser Feststoff erhalten.

b) Der Ester **242c** (88.5 mg, 114 μmol) wird in THF/H₂O (2:1, 6 mL) gelöst und mit Lithiumhydroxid (18.6 mg, 778 μmol) versetzt. Nach 30 Minuten wird Wasser (10 mL) und DCM (10 mL) hinzugegeben. Nach der Phasentrennung wird die wässrige Phase mit DCM (2x 10 mL) extrahiert. Anschließend werden die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ abgetrennt. Durch säulenchromatographische Reinigung (EE/EtOH, 9:1 + 0.1 % HOAc) wird die Carbonsäure **245** (40.0 mg, 52 μmol , 46 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, MeCN + 1 Tr. D₂O): δ = 1.34 (d, J = 7.4 Hz, 3H, 18-H), 2.80 (m, 1H, 2-H), 3.96-3.52 (m, 7-H, 2-H, 5-H, 19-H, 20-H), 3.54-3.63 (m, 2H, 23-H), 4.11-4.26 (m, 3-H, 32-H, 22-H, 17-H), 4.35 (m, 2-H, 31-H), 4.47-4.45 (m, 1H, 4-H), 7.02 – 7.12 (m, 3H, 7-H, 11-H, 12-H), 7.31-7.44 (m, 9H, 10-H, 13-H, 26-H, 27-H, 28-H, 36-H), 7.52 (m, 2H, 35-H), 7.67 (m, 2H, 37-H), 7.85 (d, J = 7.5 Hz, 2H, 34-H). **¹³C-NMR** (150 MHz, MeCN + 1 Tr. D₂O): δ = 14.5, 14.9 (18-C), 31.0 (5-C), 41.3, 43.2, 44.1, 44.2, 45.6, 46.6, 46.7, 48.0, 48.0, 50.4, 50.6, 50.7, 52.0, 52.1, 56.9, 57.0, 57.1, 61.2 (2-C, 17-C, 19-C, 20-C, 22-C, 32-C), 67.6 (31-C), 70.9 (23-C), 73.8 (24-C), 109.2 (6-C), 112.4 (10-C), 119.7, 120.2, 121.0, 122.7, 125.8, 126.3, 128.2, 128.4, 128.7, 128.7, 128.8, 129.0, 129.4 (11-C, 12-C, 13-C, 14-C, 26-C, 27-C, 28-C, 34-C, 35-C, 36-C, 37-C), 137.2, 139.0 (9-C, 25-C), 142.1 (38-C), 145.1 (33-C), 159.3 (30-C), 168.1, 173.6, 173.8, 171.5 (1-C, 3-C, 16-C, 21-C). **IR (KBr)**: 1654 (CO), 1718 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 758 (100) [M+H]⁺, 775 (75) [M+NH₄]⁺, 780 (64) [M+Na]⁺. **HR-ESI-MS**: 780.3001, berechnet für C₄₃H₄₃N₅NaO₈: 780.3004. **R_f**: 0.33 (EE/EtOH 9:1 + 0.1 % HOAc).

5.43 (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl ((*S*)-1-((2*S*,5*S*)-5-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-7-(2-((2,4-dimethoxybenzyl)amino)-2-oxoethyl)-2-methyl-3,6-dioxo-1,4,7-triazonan-1-yl)-3-(benzyloxy)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (246**, TZD-242)**



Die Säure **245** (30.1 mg, 40 μmol) wird in DCM (2 mL) gelöst und mit 2,4-Dimethoxybenzylamin (12 μl , 80 μmol), HATU (39.5 mg, 104 μmol) und DIPEA (15 μl , 110 μmol) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 15 h wird DCM (20 mL) und Kaliumhydrogensulfatlösung (1M, 10 mL) hinzugegeben. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Dichlormethan (3x 10 mL) extrahiert. Anschließend wird das Lösungsmittel

unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (EE/EtOH, 9:1) gereinigt. Das Peptid **246** (31.0 mg, 34 μmol , 86 %) wird als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeCN): δ = 1.24-1.35 (m, 2H, 18-H), 2.79–3.51 (m, 8H, 2-H, 5-H, 19-H, 20-H), 3.54-3.65 (m, 2H, 23-H), 3.65 -4.91 (m, 16H, 4-H, 17-H, 22-H, 24-H, 31-H, 32-H, 40-H, 47-H, 48-H), 6.12-6.74 (m, 5H, 15-H, 29-H, 39-H, 43-C, 45-C), 6.92–7.86 (m, 19H, 7-H, 10-H, 11-H, 12-H, 13-H, 26-H, 27-H, 28-H, 34-H, 35-H, 36-H, 37-H, 46-H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, MeCN): δ = 14.8, 15.9 (18-C), 31.2 (5-C), 38.8, 38.9, 41.3, 45.4, 46.9, 47.9, 48.0, 50.5, 50.7, 55.3, 55.9, 56.0, 56.1, 56.2, 56.2, 56.3, 57.0, 57.1, 57.4 (-C, 4-C, 17-C, 19-C, 20-C, 22-C, 31-C, 32-C, 47-C, 48-C), 67.8 (31-C), 71.1, 71.2 (23-C), 73.8, 73.9 (24-C), 99.2, 99.3, 99.4, 99.6, (43-C), 105.1, 105.2 (45-C), 108.8, 109.5, 109.7 (6-C), 112.3, 113.6 (10-C), 119.6, 120.2, 121.0, 122.7, 125.8, 126.2, 128.2, 128.6, 128.7, 128.9, 129.4, 129.4, 130.1, 130.2, 130.5, 130.7 (7-C, 11-C, 12-C, 13-C, 14-C, 26-C, 27-C, 28-C, 34-C, 35-C, 36-C, 37-C, 41-C, 46-C), 132.3, 132.7 (35-C), 137.7, (9-C), 142.2 (38-C), 145.0 (33-C), 159.5, 160.1, 161.4, 163.3, 164.1, 164.3 (30-C, 42-C, 44-C), 166.0, 166.4 (21-C), 170.7, 171.5, 172.2 (1-C, 3-C, 16-C). **IR (KBr)**: 1659 (CO) cm^{-1} . **HPLC-ESI-MS**: m/z (%) = 907 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 929 (20) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HR-ESI-MS**: 929.3866, berechnet für $\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{NaO}_9$:929.3844. **R_f**: 0.35 (EE/EtOH, 9:1).

6. Chemische Verschiebungen membrangebundener Peptide

6.1 Chemische Verschiebung von Myosuppressin in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Thr ¹	--	4.21	3.97	γ: 1.32
Asp ²	8.50	4.84	2.82, 2.78	--
Val ³	8.50	4.00	2.17	γ: 1.02, 0.98
Asp ⁴	8.32	4.49	2.74, 2.69	--
His ⁵	8.25	4.58	3.33, 3.25	δ2: 7.33, ε: /
Val ⁶	8.10	3.87	2.13	γ: 0.98, 0.85
Phe ⁷	8.04	4.55	3.26, 3.19	δ: 7.35, ε: /, ζ: /
Leu ⁸	7.84	4.21	1.75, 1.64	γ: 1.67, δ: 0.93
Arg ⁹	7.76	4.18	1.72	γ: 1.40, δ: 3.10, ε: 7.44
Phe ¹⁰	7.75	4.58	3.32, 3.01	δ: 7.37, ε: /, ζ: /
NH ₂	7.13	--	--	--

/) konnte nicht zugeordnet werden

6.2 Chemische Verschiebung von Myosuppressin in SDS-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Thr ¹	--	4.28	4.05	γ: 1.38
Asp ²	8.19	4.90	2.75, 2.89	--
Val ³	8.19	4.13	2.22	γ: 1.02
Asp ⁴	8.30	4.60	2.71	--
His ⁵	8.15	4.63	3.24	δ2: 7.13, ε: /
Val ⁶	8.00	3.97	2.07	γ: 0.96, 0.86
Phe ⁷	7.52	4.72	3.19, 3.31	δ: 7.45, ε: /, ζ: /
Leu ⁸	7.89	4.25	1.66, 1.82	γ: 1.71, δ: 0.96, 0.99
Arg ⁹	7.80	4.19	1.70	γ: 1.36, δ: 3.11, ε: 7.09
Phe ¹⁰	7.57	4.70	3.01, 3.36	δ: 7.39, ε: /, ζ: /
NH ₂	/	--	--	--

/) konnte nicht zugeordnet werden

6.3 Chemische Verschiebung von Tachykinin in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Ala ¹	--	4.29	1.53	--
Pro ²	--	4.49	1.87, 2.30	γ: 2.03, δ: 3.55, 3.70
Leu ³	8.57	4.24	1.64, 1.74	γ: 1.62, δ: 0.87, 0.82
Ser ⁴	8.10	4.14	3.81	--
Gly ⁵	8.39	3.82	--	--
Phe ⁶	8.08	4.38	3.00	δ: 7.17, ε: 7.25, ζ: 7.20
Tyr ⁷	7.89	4.30	2.84, 3.02	δ: 7.01, ε: 6.74
Gly ⁸	7.92	3.80, 3.86	--	--
Val ⁹	7.82	4.01	2.11	γ: 0.98
Arg ¹⁰	8.21	4.23	1.84, 1.71	γ: 1.64, 1.66, δ: 3.10, ε: 7.42
NH ₂	7.44	--	--	--

6.4 Chemische Verschiebung von Tachykinin in SDS-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Ala ¹	--	4.38	1.62	--
Pro ²	--	4.56	2.35	γ: 2.09, δ: 3.80, 3.56
Leu ³	8.06	4.34	1.81, 1.96	γ: 1.66, δ: 0.95, 0.90
Ser ⁴	7.91	4.06	3.91	--
Gly ⁵	8.33	4.90	--	--
Phe ⁶	7.86	4.49	3.05, 3.12	δ: 7.17, ε: 7.28, ζ: 7.24
Tyr ⁷	7.74	4.41	3.07, 2.97	δ: 7.09, ε: 6.83
Gly ⁸	7.81	3.94, 3.84	--	--
Val ⁹	7.68	4.05	2.22	γ: 1.01
Arg ¹⁰	7.89	4.26	1.85	γ: 1.75, 1.68, δ: 3.17, ε: 7.08
NH ₂	7.29	--	--	--

6.5 Chemische Verschiebungen von Helicokinin I in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.14	3.04	δ: 7.05, ε: 6.81
Phe ²	7.08	4.53	3.04	γ: 7.06, δ: /, ζ: /
Ser ³	8.07	4.53	3.65, 3.69	--
Pro ⁴	--	4.20	1.95	γ: 1.34, 1.58 δ: 3.32, 3.41
Trp ⁵	7.50	4.66	3.14, 3.35	δ1: 7.29, ε1: /, ζ2: 7.44, η2: 7.06, ζ3: 7.00, ε3: 7.59
Gly ⁶	8.00	3.87	--	--
NH ₂	/	--	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.6 Chemische Verschiebungen von Helicokinin I in SDS-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.26	3.02, 3.12	δ: 7.16, ε: 6.87
Phe ²	7.23	4.56	3.08	γ: 7.23, δ: /, ζ: /
Ser ³	7.83	4.47	3.63	--
Pro ⁴	--	4.22	2.01	γ: 1.38, 1.62, δ: 3.17, 3.26
Trp ⁵	7.25	4.73	3.23, 3.37	δ1: 7.24, ε1: 9.97, ζ2: 7.46, η2: 7.13, ζ3: 7.06, ε3: 7.60
Gly ⁶	7.84	3.88	--	--
NH ₂	/	--	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.7 Chemische Verschiebungen von Helicokinin I in wässriger Lösung

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.15	3.08	δ: 7.11, ε: 6.85
Phe ²	8.12	4.60	2.98	γ: 7.20, δ: 7.33, ζ: /
Ser ³	8.13	4.57	3.67	--
Pro ⁴	--	4.26	2.13	γ: 1.65, 1.82, δ: 3.48, 3.53
Trp ⁵	7.86	4.70	3.23, 3.35	δ1: 7.25, ε1: 10.16, ζ2: 7.53, η2: 7.26, ζ3: 7.18, ε3: 7.67
Gly ⁶	8.04	3.79	--	--
NH ₂	7.09	--	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.8 Chemische Verschiebung von [Ala⁴]-Helicokinin I in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.07	2.94	δ: 7.00, ε: 6.84
Phe ²	7.29	4.98	3.11, 3.25	δ: 8.49, ε: /, ζ: /
Ser ³	8.49	4.34	3.85, 3.89	--
Ala ⁴	8.20	4.29	1.32	--
Trp ⁵	8.01	4.66	3.27, 3.41	δ1: 7.30, ε1: 10.59, ζ2: 7.49, η2: 7.12, ζ3: 7.06, ε3: 7.61
Gly ⁶	8.23	3.90	--	--
NH ₂	/	--	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.9 Chemische Verschiebung von [D-Phe²]-Helicokinin I in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.26	2.89, 2.99	δ: 6.88, ε: 6.82
D-Phe ²	8.54	4.70	3.00, 3.13	δ: 7.31, ε: 7.34, ζ: /
Ser ³	8.55	4.51	3.78	--
Pro ⁴	--	4.40	2.06	γ: 1.42, 1.71, δ: 3.45, 3.72
Trp ⁵	7.81	4.73	3.22, 3.43	δ1: 7.37, ε1: 10.68, ζ2: 7.52, η2: 7.14, ζ3: 7.08, ε3: 7.70
Gly ⁶	8.12	3.96	--	--
NH ₂	/	--	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.10 Chemische Verschiebung von [D-Phe²]-Helicokinin I in SDS-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.27	2.64, 2.86	δ: 6.78, ε: /
D-Phe ²	8.28	4.67	2.91, 3.17	δ: 7.28, ε: /, ζ: /
Ser ³	8.12	4.47	3.65	--
Pro ⁴	--	4.31	2.06	γ: 1.33, 1.67, δ: 3.29, 3.58
Trp ⁵	7.50	4.72	3.18, 3.36	δ1: 7.03, ε1: /, ζ2: 7.41, η2: 7.09, ζ3: 7.03, ε3: 7.61
Gly ⁶	7.88	3.87	--	--
NH ₂	/	--	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.11 Chemische Verschiebung von [D-Pro⁴]-Helicokinin in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.09	2.93	δ: 7.04, ε: 6.85
Phe ²	8.56	4.41	3.06, 3.15	δ: 7.14, ε: 7.21, ζ: /
Ser ³	8.55	4.68	3.77, 3.86	--
D-Pro ⁴	--	4.48	1.71, 2.14	γ: 1.81, 1.90 δ: 3.42, 3.57
Trp ⁵	8.26	4.71	3.26, 3.40	δ1: 7.33, ε1: 10.64, ζ2: 7.52, η2: 7.13, ζ3: 7.18, ε3: 7.64
Gly ⁶	8.45	3.88, 3.94	--	--
NH ₂	/	--	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.12 Chemische Verschiebung von Cyclohelicokinin I (19) in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	9.05	4.14	3.09	δ: 6.81, ε: 6.61
Phe ²	7.63	4.50	3.40	δ: 7.10, ε: /, ζ: /
Ser ³	7.97	4.73	3.76, 4.07	--
Pro	--	4.19	0.85, 2.43	γ: 1.63, 1.98, δ: 3.24, 3.71
Trp ⁵	7.46	4.59	3.11, 3.56	δ1: 7.00, ε1: 10.59, ζ2: 7.13, η2: 6.92, ζ3: 6.58, ε3: 7.54
Gly ⁶	7.04	3.92, 4.11	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.13 Chemische Verschiebung von cyclo(Tyr-Phe-Ser-Pro-Trp-Gly-Gly-Gly-Gly) (23) in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	8.98	4.27	2.68, 2.90	δ: 7.02, ε: 6.81
Phe ²	8.15	5.01	3.21, 3.60	δ: 7.43, ε: 7.35, ζ: /
Ser ³	7.88	4.61	3.97, 4.03	--
Pro ⁴	--	4.23	0.39, 1.86	γ: 1.46, 1.67, δ: 3.33, 3.79
Trp ⁵	7.56	4.80	3.24, 3.55	δ1: 7.36, ε1: 10.59, ζ2: 7.45, η2: 7.14, ζ3: 7.26, ε3: 7.68
Gly ⁶	8.03	3.95, 4.33	--	--
Gly ⁷	7.88	3.78, 4.48	--	--
Gly ⁸	8.60	3.89, 4.28	--	--
Gly ⁹	8.54	3.75, 4.06	--	--

/ konnte nicht zugeordnet werden

6.14 Chemische Verschiebung von 145 in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.04	2.96	δ: 7.00, ε: 6.79
Phe ²	8.64	4.46	3.14, 2.89	δ: 7.17, ε: 7.13, ζ: /
Ser ³	8.64	4.64	3.79, 3.56	--
Val ⁴	--	4.04	1.61	γ: 0.88, 0.55
Trp ⁵	--	5.25	3.48, 3.38	δ1: 7.24, ε1: 10.79, ζ2: 7.46, η2: 7.05, ζ3: 7.00, ε3: 7.49
Gly ⁶	--	3.69, 2.82	--	--
NH ₂	7.50	--	--	--
C ₃ -Brücke	--	--	--	Val-CH ₂ : 3.71, 2.81, Trp-CH: 3.39; Gly-CH ₂ : 3.64, 3.29

6.15 Chemische Verschiebung von 254 in DPC-Mizellen

AS	NH	H _α	H _β	weitere
Tyr ¹	--	4.20	3.10	δ: 7.11, ε:6.83
Phe ²	8.54	4.59	3.09, 3.00	δ: 7.26, ε: /, ζ: /
Ser ³	8.22	4.64	3.52, 3.73	--
Pro ⁴	--	4.59	2.04	γ: 1.85, δ 3.62
Trp ⁵	--	5.20	3.31, 3.13	ε1: 11.14, ζ2: 7.51, η2: 7.15, ζ3: 6.99, ε3: 7.34
Gly ⁶	--	4.33, 3.63	--	--
NH ₂	7.41	--	--	--
weitere	--	--	--	CH ₂ : 4.04, 3.59, CH: 5.97

VII Literaturverzeichnis

1. Kopec, S. T. E. F. *Biol. Bull.* **1922**, *42*, 323-342.
2. Nässel, D. R. *Prog. Neurobiol.* **2002**, *68*, 1-84.
3. Starratt, A. N.; Brown, B. E. *Life Sci.* **1975**, *17*, 1253-1256.
4. Stone, J. V.; Mordue, W.; Batley, K. E.; Morris, H. R. *Nature* **1976**, *263*, 207-211.
5. Loof, A. D. *General and Comparative Endocrinology* **2008**, *155*, 3-13.
6. Gäde, G.; Marco, H. G. In *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products (Part M)*; Atta-ur, R. Ed. Structure, function and mode of action of select arthropod neuropeptides. Elsevier: **2006**; 69-139.
7. Gäde, G. The Explosion of Structural Information on Insect Neuropeptide .**1997**; 1.
8. Gäde, G.; Hoffmann, K. H.; Spring, J. H. *Phys Rev.* **1997**, *77*, 963-1032.
9. Holman, G. M.; Nachman, R. J.; Wright, M. S. *Annu. Rev. Entomol.* **1990**, *35*, 201-217.
10. Hauser, F.; Cazzamali, G.; Williamson, M.; Blenau, W.; Grimmlikhuijzen, C. J. *Prog. Neurobiol.* **2006**, *80*, 1-19.
11. Hewes, R. S.; Taghert, P. H. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1126-1142.
12. Nässel, D. R. *Naturwissenschaften* **2000**, *87*, 439-449.
13. Fónagy, A. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* **2006**, *41*, 137-152.
14. Gäde, G.; Goldsworthy, G. J. *Pest Manag. Sci.* **2003**, *59*, 1063-1075.
15. Masler, E. P.; Kelly, T. J.; Menn, J. J. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1993**, *22*, 87-111.
16. Menn, J. J.; Borkovec, A. B. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 271-278.
17. Rouhi, A. M. *Chem. Eng. News* **1996**, *74*, 23-24.
18. Vanden Broeck, J.; Schoofs, L.; De, L. A. *Trends Endocrinol. Metab.* **1997**, *8*, 321-326.
19. Orchard, I. A. N.; Donly, B. C.; Fuse, M.; Lange, A. B.; Tobe, S. S.; Bendena, W. G. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1997**, *814*, 307-309.
20. Orchard, I.; Lange, A. B.; Bendena, W. G. In *Advances in Insect Physiology*; FMRamide-related peptides: a multifunctional family of structurally related neuropeptides in insects. Academic Press: **2001**; 267-329.
21. Peeff, N. M.; Orchard, I.; Lange, A. B. *J. Insect Physiol.* **1993**, *39*, 207-215.
22. Nachman, R. J.; Roberts, V. A.; Lange, A. B.; Orchard, I.; Holman, G. M.; Teal, P. E. A. *Phytochemicals for Pest Control* **1997**, *658*, 277-291.
23. Schöller, S.; Belmont, M.; Cazzamali, G.; Hauser, F.; Williamson, M.; Grimmlikhuijzen, C. J. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *327*, 29-34.
24. RKI-Ratgeber für Ärzte.
25. Nässel, D. R. *Peptides* **1999**, *20*, 141-158.
26. Vanden Broeck, J.; Torfs, H.; Poels, J.; Van, P. W.; Swinnen, E.; Ferket, K.; De, L. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *897*, 374-387.
27. Severini, C.; Improta, G.; Falconieri-Ersamer, G.; Salvadori, S.; Ersamer, V. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 285-322.
28. Muren, J. E.; Nässel, D. R. *Peptides* **1997**, *18*, 7-15.
29. Howarth, C. J.; Prince, R. I.; Dyker, H.; Losel, P. M.; Seinsche, A.; Osborne, R. H. *J. Insect Physiol.* **2002**, *48*, 75-82.
30. Oeh, U.; Antonicek, H.; Nauen, R. *J. Insect Physiol.* **2003**, *49*, 323-337.
31. Torfs, P.; Nieto, J.; Veelaert, D.; Boon, D.; van de Water, G.; Waelkens, E.; Derua, R.; Calderon, J.; De, L. A.; Schoofs, L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *897*, 361-373.
32. Coast, G. M.; Orchard, I.; Phillips, J. E.; Schooley, D. A. In *Advances in Insect Physiology*; Insect diuretic and antidiuretic hormones. Academic Press: **2002**; 279-409.
33. Coast, G. M.; Garside, C. S. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1040*, 1-8.
34. O'Donnell, M. J.; Spring, J. H. *J. Insect Physiol.* **2000**, *46*, 107-117.
35. Blackburn, M. B.; Wagner, R. M.; Shabanowitz, J.; Kochansky, J. P.; Hunt, D. F.; Raina, A. K. *J. Insect Physiol.* **1995**, *41*, 723-730.
36. Seinsche, A.; Dyker, H.; Losel, P.; Backhaus, D.; Scherckenbeck, J. *J. Insect Physiol.* **2000**, *46*, 1423-1431.
37. Teal, P. E.; Nachman, R. J. *Peptides* **2002**, *23*, 801-806.
38. Nachman, R. J.; Coast, G. M.; Douat, C.; Fehrentz, J. A.; Kaczmarek, K.; Zabrocki, J.; Pryor, N. W.; Martinez, J. *Peptides* **2003**, *24*, 1615-1621.
39. Nathans, J.; Hogness, D. S. *Cell* **1983**, *34*, 807-814.
40. Fredriksson, R.; Schioth, H. B. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1414-1425.

41. Marsh, L.; Herskowitz, I. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1988**, *53 Pt 2*, 557-565.
42. Josefsson, L. G.; Rask, L. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 415-420.
43. Hill, C. A.; Fox, A. N.; Pitts, R. J.; Kent, L. B.; Tan, P. L.; Chrystal, M. A.; Cravchik, A.; Collins, F. H.; Robertson, H. M.; Zwiebel, L. J. *Science* **2002**, *298*, 176-178.
44. Takeda, S.; Kadowaki, S.; Haga, T.; Takaesu, H.; Mitaku, S. *FEBS Lett.* **2002**, *520*, 97-101.
45. Kulkarni, R. D.; Thon, M. R.; Pan, H. Q.; Dean, R. A. *Genome Biology* **2005**, *6*.
46. Srivastava, D. P.; Yu, E. J.; Kennedy, K.; Chatwin, H.; Reale, V.; Hamon, M.; Smith, T.; Evans, P. D. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 6145-6155.
47. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le, T., I; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
48. Bockaert, J.; Pin, J. P. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1723-1729.
49. Li, J.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Villa, C.; Schertler, G. F. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 1409-1438.
50. Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Entel, P.; Buss, V. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571-583.
51. Rasmussen, S. G.; Choi, H. J.; Rosenbaum, D. M.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Ratnala, V. R.; Sanishvili, R.; Fischetti, R. F.; Schertler, G. F.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. *Nature* **2007**, *450*, 383-387.
52. Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. *Science* **2007**, *318*, 1258-1265.
53. Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Griffith, M. T.; Roth, C. B.; Jaakola, V. P.; Chien, E. Y.; Velasquez, J.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. *Structure* **2008**, *16*, 897-905.
54. Warne, T.; Serrano-Vega, M. J.; Baker, J. G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P. C.; Henderson, R.; Leslie, A. G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F. *Nature* **2008**, *454*, 486-491.
55. Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y.; Lane, J. R.; Ijzerman, A. P.; Stevens, R. C. *Science* **2008**, *322*, 1211-1217.
56. Murakami, M.; Kouyama, T. *Nature* **2008**, *453*, 363-367.
57. Gautier, A.; Mott, H. R.; Bostock, M. J.; Kirkpatrick, J. P.; Nietlispach, D. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 768-774.
58. Grace, C. R.; Perrin, M. H.; Gulyas, J.; Digruccio, M. R.; Cattle, J. P.; Rivier, J. E.; Vale, W. W.; Riek, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 4858-4863.
59. Inooka, H.; Ohtaki, T.; Kitahara, O.; Ikegami, T.; Endo, S.; Kitada, C.; Ogi, K.; Onda, H.; Fujino, M.; Shirakawa, M. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 161-165.
60. Luca, S.; White, J. F.; Sohal, A. K.; Filippov, D. V.; van Boom, J. H.; Grisshammer, R.; Baldus, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 10706-10711.
61. Lopez, J. J.; Shukla, A. K.; Reinhart, C.; Schwalbe, H.; Michel, H.; Glaubitz, C. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2008**, *47*, 1668-1671.
62. Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512-523.
63. Schwyzer, R. *J. Recept. Res.* **1991**, *11*, 45-57.
64. Schwyzer, R. *Biopolymers* **1991**, *31*, 785-792.
65. Schwyzer, R. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1992**, *25*, 1077-1089.
66. Schwyzer, R. *Biopolymers* **1995**, *37*, 5-16.
67. Schwyzer, R. *J. Mol. Recognit.* **1995**, *8*, 3-8.
68. Bader, R.; Zerbe, O. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1520-1534.
69. Liu, L. P.; Deber, C. M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5476-5482.
70. White, S. H.; Wimley, W. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 339-352.
71. Sanderson, J. M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 201-212.
72. Moroder, L.; Romano, R.; Guba, W.; Mierke, D. F.; Kessler, H.; Delporte, C.; Winand, J.; Christophe, J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13551-13559.
73. De Luca S.; Ragone, R.; Bracco, C.; Digilio, G.; Tesauro, D.; Saviano, M.; Pedone, C.; Morelli, G. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 156-169.
74. Guba, W.; Haessner, R.; Breipohl, G.; Henke, S.; Knolle, J.; Santagada, V.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7532-7540.
75. Fiori, S.; Renner, C.; Cramer, J.; Pegoraro, S.; Moroder, L. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 163-175.
76. Rudolph-Böhner, S.; Quarzago, D.; Czisch, M.; Ragnarsson, U.; Moroder, L. *Biopolymers* **1997**, *41*, 591-606.
77. Scrima, M.; Di Marino, S.; Grimaldi, M.; Mastrogiacomo, A.; Novellino, E.; Bifulco, M.; D'Ursi, A. M. *Biochemistry* **2010**, *49*, 10449-10457.
78. Holman, G. M.; Cook, B. J.; Nachman, R. J. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **1986**, *84*, 205-211.
79. Taneja-Bageshwar, S.; Strey, A.; Zubrzak, P.; Pietrantonio, P. V.; Nachman, R. J. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2006**, *62*, 128-140.

80. Taneja-Bageshwar, S.; Strey, A.; Kaczmarek, K.; Zabrocki, J.; Pietrantonio, P. V.; Nachman, R. J. *Peptides* **2008**, *29*, 295-301.
81. Coast, G. M.; Holman, G. M.; Nachman, R. J. *J. Insect Physiol.* **1990**, *36*, 481-488.
82. Nachman, R. J.; Holman, G. M. *ACS Symp. Ser.* **1991**, *453*, 194-214.
83. Roberts, V. A.; Nachman, R. J.; Coast, G. M.; Hariharan, M.; Chung, J. S.; Holman, G. M.; Williams, H.; Tainer, J. A. *Chemistry & Biology* **1997**, *4*, 105-117.
84. Nachman, R. J.; Holman, G. M.; Hayes, T. K.; Beier, R. C. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1993**, *42*, 372-377.
85. Bader, R.; Bettio, A.; Beck-Sickinger, A. G.; Zerbe, O. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 307-329.
86. Nachman, R. J.; Holman, G. M.; Coast, G. M. *Soc. Exp. Biol. Semin. Ser.* **1998**, *65*, 379-391.
87. Popot, J. L.; Engelman, D. M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4031-4037.
88. Roberts, V. A.; Nachman, R. J.; Coast, G. M.; Hariharan, M.; Chung, J. S.; Holman, G. M.; Williams, H.; Tainer, J. A. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 105-117.
89. Nachman, R. J.; Roberts, V. A.; Dyson, H. J.; Holman, G. M.; Tainer, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 4518-4522.
90. Roberts, V. A.; Nachman, R. J.; Coast, G. M.; Hariharan, M.; Chung, J. S.; Holman, G. M.; Williams, H.; Tainer, J. A. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 105-117.
91. Moyna, G.; Williams, H. J.; Nachman, R. J.; Scott, A. I. *Biopolymers* **1999**, *49*, 403-413.
92. Taneja-Bageshwar, S.; Strey, A.; Kaczmarek, K.; Zabrocki, J.; Pietrantonio, P. V.; Nachman, R. J. *Peptides* **2008**, *29*, 295-301.
93. Kaczmarek, K.; Williams, H. J.; Coast, G. M.; Scott, A. I.; Zabrocki, J.; Nachman, R. J. *Peptide Science* **2007**, *88*, 1-7.
94. Nachman, R. J.; Kaczmarek, K.; Williams, H. J.; Coast, G. M.; Zabrocki, J. *Biopolymers* **2004**, *75*, 412-419.
95. Nachman, R. J.; Zabrocki, J.; Olczak, J.; Williams, H. J.; Moyna, G.; Ian, S. A.; Coast, G. M. *Peptides* **2002**, *23*, 709-716.
96. Garcia, K. C.; Ronco, P. M.; Verroust, P. J.; Brunger, A. T.; Amzel, L. M. *Science (Washington, D. C., 1883-)* **1992**, *257*, 502-507.
97. Stanfield, R. L.; Fieser, T. M.; Lerner, R. A.; Wilson, I. A. *Science* **1990**, *248*, 712-719.
98. Rini, J. M.; Schulze-Gahmen, U.; Wilson, I. A. *Science* **1992**, *255*, 959-965.
99. Nikiforovich, G. V.; Marshall, G. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195*, 222-228.
100. Plucinska, K.; Kataoka, T.; Yodo, M.; Cody, W. L.; He, J. X.; Humblet, C.; Lu, G. H.; Lunney, E.; Major, T. C.; Panek, R. L.; et, a. *J Med Chem* **1993**, *36*, 1902-1913.
101. Kyle, D. J.; Blake, P. R.; Smithwick, D.; Green, L. M.; Martin, J. A.; Sinsko, J. A.; Summers, M. F. *J Med Chem* **1993**, *36*, 1450-1460.
102. Walford, S. P.; Campbell, M. M.; Horwell, D. C. *J Pharm Pharmacol* **1996**, *48*, 188-191.
103. Brady, S. F.; Paleveda, W. J., Jr.; Arison, B. H.; Saperstein, R.; Brady, E. J.; Raynor, K.; Reisine, T.; Veber, D. F.; Freidinger, R. M. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3449-3466.
104. Nutt, R. F.; Veber, D. F.; Saperstein, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6539-6545.
105. Toniolo, C. *CRC Crit Rev. Biochem.* **1980**, *9*, 1-44.
106. Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 253-260.
107. Grathwohl, C.; Wüthrich, K. *Biopolymers* **1981**, *20*, 2623-2633.
108. Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.
109. Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. *Biochim. Biophys. Acta, Prot. Struct* **1973**, *303*, 211-229.
110. Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. *Protein Science* **1994**, *3*, 2207-2216.
111. Richardson, J. S. *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167-339.
112. Crawford, J. L.; Lipscomb, W. N.; Schellman, C. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 538-542.
113. Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303-1326.
114. Gante, J. *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802.
115. Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104-109.
116. Garvey, D. S.; May, P. D.; Nadzan, A. M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 936-940.
117. Wolf, J. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3164-3173.
118. Egner, U.; Mueller-Farnow, A.; Eckle, E. *Pestic. Sci.* **1997**, *51*, 95-99.
119. Ramsay, J. A. *J. Exp. Biol.* **1954**, *31*, 104-113.
120. RAMSAY, J. A. *J. Exp. Biol.* **1954**, *31*, 104-113.
121. Antonicek, H. P., Schnizler, K., and Weidler, M.; [WO2003087356A2], **2003**, Bayer CropScience AG, Germany, Patent.
122. Haack, M.; Beck-Sickinger, A. In *Combinatorial Chemistry on Solid Supports*; Bräse, S. Ed. Multiple Peptide Synthesis to Identify Bioactive Hormone Structures. Springer Berlin / Heidelberg: **2007**; 243-288.
123. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
124. Eifler-Lima, V. L.; Graebin, C. S.; Uchoa, F. D. T.; Duarte, P. D.; Correa, A. G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1401-1423.

125. Dorner, B.; Ostresh, J. M.; Blondelle, S. E.; Dooley, C. T.; Houghten, R. A. *Adv. Amino Acid Mimetics Peptidomimetics* **1997**, *1*, 109-125.
126. Rink, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
127. Bernatowicz, M. S.; Daniels, S. B.; Köster, H. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645-4648.
128. Humphrey, J. M.; Chamberlin, A. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266.
129. Bozso, Z.; Toth, G.; Murphy, R. F.; Lovas, S. *Let. Pept. Sci.* **2000**, *7*, 157-163.
130. Barlos, K.; Mamos, P.; Papaioannou, D.; Patrianakou, S.; Sanida, C.; Schäfer, W. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, *1987*, 1025-1030.
131. Carpino, L. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Mansour, E. S.; Wenschuh, H.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829-7832.
132. Nachman, R. J.; Coast, G. M.; Holman, G. M.; Beier, R. C. *Peptides* **1995**, *16*, 809-813.
133. Chen, H.; Zhong, X.; Wei, J. *Molecules* **2007**, *12*, 1170-1182.
134. Chen, H.; Scherkenbeck, J.; Zdobinsky, T.; Antonicek, H. *Protein Pept. Lett.* **2010**, *17*, 431-436.
135. Kamoune, L.; De Borggraeve, W. M.; Verbist, B. M. P.; Broeck, J. V.; Coast, G. M.; Compennolle, F.; Hoornaert, G. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9555-9562.
136. Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127.
137. Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37.
138. Ernst, R. R.; Anderson, W. A. *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93-102.
139. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986.
140. Evans, J. N. S. *Biomolecular NMR Spectroscopy*; Oxford University Press: Oxford, 1995.
141. Croasmun, W. R.; Carlson, R. M. K. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*; VCH Publishers. Inc.: New York, 1994.
142. Lauterbur, P. C. *Nature* **1973**, *242*, 190-191.
143. Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.
144. Ernst, R. R.; Bodenhaus, G.; Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two Dimensions*; Clarendon Press: Oxford, 1987.
145. Bader, R.; Lerch, M.; Zerbe, O. In *BioNMR in Drug Research*; Zerbe, O. Ed. NMR of Membrane-Associated Peptides and Proteins. Wiley-VCH: Weinheim, **2003**; 95-120.
146. Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
147. Lazaridis, T.; Mallik, B.; Chen, Y. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15098-15106.
148. Langham, A.; Waring, A.; Kaznessis, Y. N. *BMC Biochemistry* **2007**, *8*, 11.
149. Brito, R. M. M.; Vaz, W. L. C. *Anal. Biochem.* **1986**, *152*, 250-255.
150. Chattopadhyay, A.; London, E. *Anal. Biochem.* **1984**, *139*, 408-412.
151. Hjelmeland, L. M.; Nebert, D. W.; Osborne, J. C. *Anal. Biochem.* **1983**, *130*, 72-82.
152. Edinin, M. *Membrane Structure*; Elsevier/North-Holland Biomedical Press: Amsterdam, 1981; pp. 37-82.
153. Walker, J. E.; Carne, A. F.; Schmitt, H. W. *Nature* **1979**, *278*, 653-654.
154. Helenius, A.; McCaslin, D. R.; Fries, E.; Tanford, C. In *Methods in Enzymology; Biomembranes Part G: Bioenergetics: Biogenesis of Mitochondria, Organization, and Transport*; Sidney Fleischer, L. P. Ed. [63] Properties of detergents. Academic Press: **1979**; 734-749.
155. Lauterwein, J.; Bösch, C.; Brown, L. R.; Wüthrich, K. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1979**, *556*, 244-264.
156. Bartels, C.; Xia, T. h.; Billeter, M.; G+ntert, P.; Wüthrich, K. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 1-10.
157. Cavenagh, J.; Fairbrother, W. J.; Palmer III, A. G.; Rance, M.; Skelton, N. J. *Protein NMR Spectroscopy*; Elsevier Academic Press: Burlington, 2007.
158. G+ntert, P.; Berndt, K. D.; Wüthrich, K. *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 601-606.
159. G+ntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 283-298.
160. G+ntert, P. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *278*, 353-378.
161. Ortega Roldan, J.; Romero Romero, M.; Ora, A.; AB, E.; Lopez Mayorga, O.; Azuaga, A.; van Nuland, N. J. *Biomol. NMR* **2007**, *39*, 331-336.
162. O'Leary, J. M.; Hamilton, J. M.; Deane, C. M.; Valeyev, N. V.; Sandell, L. J.; Downing, A. K. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53857-53866.
163. Ridder, A. N. J. A.; Morein, S.; Stam, J. G.; Kuhn, A.; de Kruijff, B.; Killian, J. A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6521-6528.
164. Royer, C. A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769-1784.
165. Yan, Y.; Marriott, G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 635-640.
166. Loidl, G.; Musiol, H. J.; Budisa, N.; Huber, R.; Poirot, S.; Fourmy, D.; Moroder, L. *J. Peptide Sci.* **2000**, *6*, 139-144.
167. Cohen, B. E.; McAnaney, T. B.; Park, E. S.; Jan, Y. N.; Boxer, S. G.; Jan, L. Y. *Science* **2002**, *296*, 1700-1703.
168. Reissmann, S.; Imhof, D. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2823-2844.
169. Koppitz, M.; Mathä, B.; Kessler, H. *J. Peptide Sci.* **1999**, *5*, 507-518.

170. Meyer, A.; Auernheimer, J.; Modlinger, A.; Kessler, H. *Curr. Pharm. Des* **2006**, *12*, 2723-2747.
171. Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriou, P.; Wenqing, Y.; Schäfer, W. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
172. Souers, A. J.; Virgilio, A. A.; Sch³rer, S. S.; Ellman, J. A.; Kogan, T. P.; West, H. E.; Ankener, W.; Vanderslice, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2297-2302.
173. Virgilio, A. A.; Sch³rer, S. C.; Ellman, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6961-6964.
174. Kaul, R.; Surprenant, S.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4901-4902.
175. Rombouts, F. J. R.; Van den Bossche, J.; Toppet, S. M.; Compennolle, F.; Hoornaert, G. J. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4721-4731.
176. Johannesson, P.; Lindeberg, G.; Tong, W.; Gogoll, A.; Karlén, A.; Hallberg, A. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 601-608.
177. de Amezua, M. G.; Lora-Tamayo, M.; Soto, J. L. *Tetrahedron Lett.* **1970**, 2407-2408.
178. Moon, M. W.; [US3706743A], **1972**, Upjohn Co., Patent.
179. Bittermann, H.; Böckler, F.; Einsiedel, J.; Gmeiner, P. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6315-6322.
180. Golebiowski, A. and Klopfenstein, S. R.; [WO2001046197A1], **2001**, Procter + Gamble Co., USA, Patent.
181. Raghavan, B.; Skoblenick, K. J.; Bhagwanth, S.; Argintaru, N.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2043-2051.
182. Golebiowski, A.; Jozwik, J.; Klopfenstein, S. R.; Colson, A. O.; Grieb, A. L.; Russell, A. F.; Rastogi, V. L.; Diven, C. F.; Portlock, D. E.; Chen, J. J. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 584-590.
183. Golebiowski, A.; Klopfenstein, S. R.; Shao, X.; Chen, J. J.; Colson, A. O.; Grieb, A. L.; Russell, A. F. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2615-2617.
184. Limbach, M.; Korotkov, V. S.; Es-Sayed, M.; de, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3816-3822.
185. Belov, V. N.; Funke, C.; Labahn, T.; Es-Sayed, M.; de, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1345-1356.
186. Bhatt, U.; Just, G. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 722-727.
187. Fukuyama, T.; Jow, C. K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373-6374.
188. Bhatt, U.; Mohamed, N.; Just, G.; Roberts, E. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3679-3682.
189. Olsen, C. A.; Witt, M.; Hansen, S. H.; Jaroszewski, J. W.; Franzyk, H. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6046-6055.
190. Biron, E.; Chatterjee, J.; Kessler, H. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 213-219.
191. Demmer, O.; Dijkgraaf, I.; Schottelius, M.; Wester, H. J.; Kessler, H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2015-2018.
192. Russell Bowman, W.; Coghlan, D. R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15787-15798.
193. Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.
194. Lencina, C. L.; Dassonville-Klimpt, A.; Sonnet, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1689-1697.
195. Tian, X.; Switzer, A. G.; Derosé, S. A.; Mishra, R. K.; Solinsky, M. G.; Mumin, R. N.; Ebetino, F. H.; Jayasinghe, L. R.; Webster, M. E.; Colson, A. O.; Crossdoersen, D.; Pinney, B. B.; Farmer, J. A.; Dowty, M. E.; Obringer, C. M.; Cruze, C. A.; Burklow, M. L.; Suchanek, P. M.; Dong, L.; Dirr, M. K.; Sheldon, R. J.; Wos, J. A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6055-6066.
196. Macdonald, J. M.; Horsley, H. T.; Ryan, J. H.; Saubern, S.; Holmes, A. B. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4227-4229.
197. Cohen, S. B.; Halcomb, R. L. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 405-407.
198. Kizuka, H.; Hanson, R. N. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 722-726.
199. Stephenson, K. A.; Wilson, A. A.; Meyer, J. H.; Houle, S.; Vasdev, N. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5093-5100.
200. Chen, Y.; John, A.; Panek, J. S. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1529-1532.
201. D'hooghe, M.; Catak, S.; Stankovi-ç, S.; Waroquier, M.; Kim, Y.; Ha, H. J.; Van Speybroeck, V.; De Kimpe, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 4920-4931.
202. Wu, Y. C.; Zhu, J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5558-5561.
203. He, B.; Song, H.; Du, Y.; Qin, Y. *J. Org. Chem.* **2008**, *74*, 298-304.
204. Allan, K. M.; Stoltz, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17270-17271.
205. Pichowicz, M.; Simpkins, N. S.; Blake, A. J.; Wilson, C. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3713-3735.
206. Gupta, S.; Macala, M.; Schafmeister, C. E. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8691-8695.
207. Le Bourdonnec, B.; Goodman, A. J.; Graczyk, T. M.; Belanger, S.; Seida, P. R.; DeHaven, R. N.; Dolle, R. E. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7290-7306.
208. Chan, M. F.; Raju, B. G.; Kois, A.; Varughese, J. I.; Varughese, K. I.; Balaji, V. N. *Heterocycles* **1999**, *51*, 5-8.
209. Liu, J.; Wu, G.; Cui, G.; Wang, W. X.; Zhao, M.; Wang, C.; Zhang, Z.; Peng, S. *Bioorg. Med. Chem* **2007**, *15*, 5672-5693.
210. Wardrop, D. J.; Basak, A. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1053-1056.
211. CHEM3D, MM2-Kraftfeld.
212. Nicolaou, K. C.; Nevalainen, M.; Zak, M.; Bulat, S.; Bella, M.; Safina, B. S. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3540-3546.

213. Hanessian, S.; Lavalley, P. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **1975**, *53*, 2975-2977.
214. Nair, V.; Deepthi, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1862-1891.
215. Hungerhoff, B.; Samanta, S. S.; Roels, J.; Metz, P. *Synlett* **2000**, *2000*, 77,79.
216. Nishida, H.; Saitoh, F.; Hirabayashi, T.; Chackalamannil, S.; Chan, T. Y.; Chelliah, M. V.; Clasby, M. C.; Dwyer, M. P.; Greenlee, W. J., and Xia, Y.; [WO2010065717A1], **2010**, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Japan; Schering Corporation, Patent.
217. Tosovska, P.; Arora, P. S. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1588-1591.
218. Peng, H.; Carrico, D.; Thai, V.; Blaskovich, M.; Bucher, C.; Pusateri, E. E.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1768-1784.
219. Herold, P.; Mah, R.; Stutz, S.; Stojanovic, A.; Tschinke, V.; Marti, C., and Schumacher, C.; [EP1707206A1], **2006**, Speedel Experimenta A.-G., Switz., Patent.
220. Garcia-Aranda, M. I.; Marrero, P.; Gautier, B.; Martin-Martinez, M.; Inguibert, N.; Vidal, M.; Garcia-Lopez, M. T.; Jimenez, M. A.; Gonzalez-Muniz, R.; de Vega, M. J. P. *Bioorg. Med. Chem* **2011**, *19*, 1978-1986.
221. Jacobsen, O.; Klaveness, J.; Rongved, P. *Molecules* **2010**, *15*, 6638-6677.
222. Quinn, R. K.; Cianci, A. L.; Beaudoin, J. A.; Sculimbrene, B. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4382-4385.
223. Robinson, A. J.; van Lierop, B. J.; Garland, R. D.; Teoh, E.; Elaridi, J.; Illesinghe, J. P.; Jackson, W. R. *Chem Commun. (Camb.)* **2009**, 4293-4295.
224. Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805-16811.
225. Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Davis, B. G. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 959-969.
226. Burtscher, D.; Grela, K. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 450-462.
227. Hoffman, R. V.; Kim, H. O. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 3007-3020.
228. Cantel, S.; Desgranges, S.; Martinez, J.; Fehrentz, J. A. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 326-328.
229. Vallee, E.; Loemba, F.; Etheve-Quelquejeu, M.; Valøry, J. M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2191-2195.
230. Tanaka, M.; Kurosaki, Y.; Washio, T.; Anada, M.; Hashimoto, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8799-8802.
231. Biron, E.; Kessler, H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5183-5189.
232. Turner, J. J.; Filippov, D. V.; Overhand, M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5763-5767.
233. Lenman, M. M.; Ingham, S. L.; Gani, D. *Chem. Commun.* **1996**, 85-87.
234. Kotthaus, A. F. *Untersuchungen an einem neuen spirocyclischen Glycinbaustein, abgeleitet von Menthon. Dissertation, Bergische Universität Wuppertal* **2005**.
235. Zapf, C. W.; Del Valle, J. R.; Goodman, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4033-4036.
236. Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
237. van Der Auwera, C.; Anteunis, M. J. O. *Bull. Soc. Chim. Belges* **1986**, *95*, 203-205.
238. Li, P.; Xu, J. C. *Chem. Lett.* **2000**, 204-205.
239. Cluzeau, J.; Oishi, S.; Ohno, H.; Wang, Z.; Evans, B.; Peiper, S. C.; Fujii, N. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1915-1923.
240. Dougherty, J. M.; Jimenez, M.; Hanson, P. R. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6218-6230.
241. Kaul, R.; Surprenant, S.; Lubell, W. D. *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 3838-3844.
242. Creighton, C. J.; Du, Y. M.; Reitz, A. B. *Bioorg. Med. Chem* **2004**, *12*, 4375-4385.
243. Hoffmann, T.; Waibel, R.; Gmeiner, P. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 62-69.
244. Schmidt, B.; Kuhn, C.; Ehlert, D. K.; Lindeberg, G.; Lindman, S.; Karlen, A.; Hallberg, A. *Bioorg. Med. Chem* **2003**, *11*, 985-990.
245. Dimartino, G.; Wang, D. Y.; Chapman, R. N.; Arora, P. S. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2389-2392.
246. Rao, I. N.; Boruah, A.; Kumar, S. K.; Kunwar, A. C.; Devi, A. S.; Vyas, K.; Ravikumar, K.; Iqbal, J. *Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 2181-2184.
247. Oishi, S.; Karki, R. G.; Shi, Z. D.; Worthy, K. M.; Bindu, L.; Chertov, O.; Esposito, D.; Frank, P.; Gillette, W. K.; Maderia, M.; Hartley, J.; Nicklaus, M. C.; Barchi, J. J.; Fisher, R. J.; Burke, T. R. *Bioorg. Med. Chem* **2005**, *13*, 2431-2438.
248. Oishi, S.; Shi, Z. D.; Worthy, K. M.; Bindu, L. K.; Fisher, R. J.; Burke, T. R. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 668-674.
249. Rajesh, S.; Banerji, B.; Iqbal, J. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 7852-7857.
250. Anthoine Dietrich, S.; Banfi, L.; Basso, A.; Damonte, G.; Guanti, G.; Riva, R. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 97-106.
251. Hebach, C.; Kazmaier, U. *Chem. Commun.* **2003**, 596-597.
252. Fürstner, A.; Langemann, K. *Synthesis* **1997**, *1997*, 792,803.
253. Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168-8179.
254. Hoveyda, A. H.; Gillingham, D. G.; Van Veldhuizen, J. J.; Kataoka, O.; Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Harrity, J. P. A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 8-23.

255. Kingsbury, J. S.; Harrity, J. P. A.; Bonitatebus, P. J.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 791-799.
256. Grela, K.; Harutyunyan, S.; Michrowska, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4038-4040.
257. Michrowska, A.; Bujok, R.; Harutyunyan, S.; Sashuk, V.; Dolgonos, G.; Grela, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9318-9325.
258. Zhan, Z. Y.; [WO2007003135A1], **2007**, Peop. Rep. China, Patent.
259. Stewart, I. C.; Douglas, C. J.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 441-444.
260. Stewart, I. C.; Ung, T.; Pletnev, A. A.; Berlin, J. M.; Grubbs, R. H.; Schrodi, Y. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1589-1592.
261. Fustero, S.; Sanchez-Rosello, M.; Jiminez, D.; Sanz-Cervera, J. F.; del Pozo, C.; Acena, J. L. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2706-2714.
262. Reichwein, J. F.; Versluis, C.; Liskamp, R. M. J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6187-6195.
263. Wissmann, H.; Kleiner, H.-J. *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 129-130.
264. Park, J. E.; Bae, B. J.; Kim, Y.; Park, J. T.; Suh, I. H. *Organometallics* **1999**, *18*, 1059-1067.
265. Reichwein, J. F.; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1243-1246.
266. Hili, R.; Rai, V.; Yudin, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2889-2891.
267. Yang, T.; Lin, C.; Fu, H.; Jiang, Y.; Zhao, Y. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4781-4784.
268. Sonntag, L. S.; Ivan, S.; Langer, M.; Conza, M. M.; Wennemers, H. *Synlett* **2004**, *2004*, 1270,1272.
269. Davies, J. S. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 471-501.
270. Nam, N. H.; Ye, G.; Sun, G.; Parang, K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3131-3141.
271. Nishida, H.; Miyazaki, Y.; Mukaihira, T.; Saitoh, F.; Fukui, M.; Harada, K.; Itoh, M.; Muraoka, A.; Matsusue, T.; Okamoto, A.; Hosaka, Y.; Matsumoto, M.; Ohnishi, S.; Mochizuki, H. *Chem Pharm. Bull. (Tokyo)* **2002**, *50*, 1187-1194.
272. Friedrich, K.; Zamkane, M.; Zimmer, R. *J. prakt. Chem.* **2000**, *342*, 404-408.
273. Opatz, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 4113-4118.
274. Kurihara, H.; Mishima, H. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3639-3640.
275. Veerman, J. J.; Bon, R. S.; Hue, B. T.; Girones, D.; Rutjes, F. P.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4486-4494.
276. Breipohl, G.; Will, D. W.; Peyman, A.; Uhlmann, E. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14671-14686.
277. Stanley, M. S. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6421-6430.
278. Zhu, Y.; Gieselmann, M. D.; Zhou, H.; Averin, O.; van der Donk, W. A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3304-3315.
279. Niida, A.; Tanigaki, H.; Inokuchi, E.; Sasaki, Y.; Oishi, S.; Ohno, H.; Tamamura, H.; Wang, Z.; Peiper, S. C.; Kitaura, K.; Otaka, A.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3942-3951.
280. Henry, J. R.; Marcin, L. R.; McIntosh, M. C.; Scola, P. M.; Davis Harris, G.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5709-5712.
281. Otsubo, N.; Tsukumo, Y.; Uchida, K.; Matsumoto, Y.; Iida, K.; Takada, H.; Takizawa, F.; Arai, H.; Okazaki, S.; and Imaizumi, T.; [WO2008149834A1], **2008**, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Japan, Patent.
282. Falkiewicz, B.; Kolodziejczyk, A. S.; Liberek, B.; Wisniewski, K. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7909-7917.
283. Hu, X. E.; Kim, N. K.; Gray, J. L.; Almstead, J. I.; Seibel, W. L.; Ledoussal, B. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3655-3661.
284. Ducept, P.; Gubler, D. A.; Williams, R. M. *Heterocycles* **2006**, *67*, 597-+.
285. Nielsen, J.; Jensen, F. R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2011-2014.
286. Grab, T.; Brønse, S. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1765-1768.
287. Han, Y.; Giragossian, C.; Mierke, D. F.; Chorev, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5085-5097.
288. Jensen, K. B.; Braxmeier, T. M.; Demarcus, M.; Frey, J. G.; Kilburn, J. D. *Chemistry* **2002**, *8*, 1300-1309.
289. Khalil, E. M.; Subasinghe, N. L.; Johnson, R. L. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3441-3444.
290. Papeo, G.; Giordano, P.; Brasca, M. G.; Buzzo, F.; Caronni, D.; Ciprandi, F.; Mongelli, N.; Veronesi, M.; Vulpetti, A.; Dalvit, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5665-5672.
291. "The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group" in *The Peptides*, S.Udenfriend and J.Meienhofer, Eds.Academic Press, New York.
292. Tantry, S. J.; Venkataramanarao, R.; Chennakrishna, G.; Sureshbabu, V. V. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9360-9363.
293. Pearlman, W. M. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 1663-1664.
294. Somu, R. V.; Johnson, R. L. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5954-5963.
295. Veitch, G. E.; Bridgwood, K. L.; Ley, S. V. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3623-3625.
296. Bailen, M. A.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J.; Najera, C. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9809-9813.
297. Coste, J.; Frérot, E.; Jouin, P.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1967-1970.
298. El-Faham, A. *Chem. Lett.* **1998**, 671-672.
299. Wilchek, M.; Patchornik, A. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 1629-1630.

300. Tong, G. *Huagong Shikan* **2006**, *20*, 29-30.
301. Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Peptides (N. Y.)* **1987**, *9*, 1-38.
302. Kachalova, A.; Stetsenko, D.; Romanova, E.; Tashlitsky, V.; Gait, M.; Oretskaya, T. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2409-2416.
303. Micuch, P.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 1567-1577.
304. Nomura, S., Kawanishi, E., and Ueta, K.; [WO2005012326A1], **2005**, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Japan, Patent.
305. Fara, M. A.; Diaz-Mochon, J. J.; Bradley, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1011-1014.
306. Vining, L. C. *Can. J. Chem.* **1963**, *41*, 2903-2904.
307. Yamazaki, Y.; Mori, Y.; Oda, A.; Okuno, Y.; Kiso, Y.; Hayashi, Y. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3688-3694.
308. Stark, T.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7222-7231.
309. Campbell, J.; Lin, Q.; Geske, G. D.; Blackwell, H. E. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1051-1059.
310. Durow, A. C.; Long, G. C.; O'Connell, S. J.; Willis, C. L. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5401-5404.
311. Nicolaou, K. C.; Estrada, A. A.; Zak, M.; Lee, S. H.; Safina, B. S. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1402-1406.
312. Chern, C. Y.; Huang, Y. P.; Kan, W. M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1039-1041.
313. Weygand, F.; Steglich, W.; Bjarnason, J.; Akhtar, R.; Chytil, N. *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 3623-3641.
314. Theodorou, V.; Karkatsoulis, A.; Kinigopoulou, M.; Ragoussis, V.; Skobridis, K. *ARKIVOC (Gainesville, FL, U. S.)* **2009**, 277-287.
315. Artuso, F.; Sindona, G.; Athanassopoulos, C.; Stavropoulos, G.; Papaioannou, D. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9309-9312.
316. Zhang, W. J.; Berglund, A.; Kao, J. L. F.; Couty, J. P.; Gershengorn, M. C.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1221-1235.
317. Wrona, I. E.; Lowe, J. T.; Turbyville, T. J.; Johnson, T. R.; Beignet, J.; Beutler, J. A.; Panek, J. S. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1897-1916.
318. Lowe, J. T.; Wrona, I. E.; Panek, J. S. *Org. Lett.* **2006**, *9*, 327-330.
319. Yadav, J. S.; Chetia, L. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4587-4589.
320. Evans, D. A.; Trotter, B. W.; Cote, B.; Coleman, P. J.; Dias, L. C.; Tyler, A. N. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2744-2747.
321. Bröhmer, M. C.; Munding, S.; Bräse, S.; Bannwarth, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6175-6177.
322. Nachman, R. J.; Kim, Y. J.; Wang, X. J.; Etzkorn, F. A.; Kaczmarek, K.; Zabrocki, J.; Adams, M. E. *Bioorg. Med. Chem* **2009**, *17*, 4216-4220.
323. Cox, K. J. A.; Tensen, C. P.; VanderSchors, R. C.; Li, K. W.; vanHeerikhuizen, H.; Vreugdenhil, E.; Geraerts, W. P. M.; Burke, J. F. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 1197-1205.
324. McLoughlin, D. J.; Bertelli, F.; Williams, C. *Expert Opin. Drug Discov.* **2007**, *2*, 603-619.
325. Fitch, R. W.; Xiao, Y.; Kellar, K. J.; Daly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4909-4914.
326. Henry, G. D.; Sykes, B. D. In *Methods in Enzymology; Nuclear Magnetic Resonance, Part C*; Thomas, L. J. Ed. [18] Methods to study membrane protein structure in solution. Academic Press: **1994**; 515-535.
327. McDonnell, P. A.; Opella, S. J. *J. Magn. Reson.* **1993**, *102*, 120-125.
328. Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 51-55.
329. Groselj, U.; Bevk, D.; Jakse, R.; Meden, A.; Pirc, S.; Recnik, S.; Stanovnik, B.; Svete, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2367-2383.