



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
FAKULTÄT FÜR CHEMIE



BIOSYSTEMCHEMIE

Studien zur chemo-enzymatischen Totalsynthese komplexer Peptide mit Biaryl-Strukturelementen

Hülya Aldemir

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Hubert A. Gasteiger

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Tobias A. M. Gulder

2. Univ.-Prof. Dr. Aymelt Itzen

Die Dissertation wurde am 05.11.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19.11.2015 angenommen.

Meiner Familie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Tobias A. M. Gulder am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefangen und an der Technischen Universität München fertiggestellt.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Tobias Gulder für die Möglichkeit danken an diesem interessanten und herausfordernden Thema arbeiten zu dürfen. Nicht nur für die gute Betreuung durch viele hilfreiche Anregungen und die Zeit für die Klärung endloser Fragen, sondern auch für das Lehren neuer Techniken und Methoden und vor allem für die motivierenden Worte, wenn die Arbeit mal nicht gut verlief, bedanke ich mich herzlichst.

Prof. Dr. Aymelt Itzen danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens dieser Arbeit sowie Prof. Dr. Hubert A. Gasteiger für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission. Für die finanzielle Unterstützung danke ich den Fonds der chemischen Industrie.

Ganz herzlich danke ich Françoise Schaefers, René Richarz, Jana Kundert, Anna Glöckle und Dr. Mike Freeman für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie hilfreiche Tipps.

Ein besonderer Dank geht an René Richarz, für die gute Zusammenarbeit und für das Nahebringen der mikrobiologischen Arbeiten.

Dem ganzen Arbeitskreis TAMGulder möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und die schöne Zeit auch außerhalb des Labors danken. Insbesondere Françoise Schaefers danke ich cok cok für alles. Jana Kundert sende ich einen Chitiri-Dank für das stetige Motivieren und für das Herausholen aus dem Loch. Janine Antosch danke ich für ihre positive Einstellung mit der sie Berge bewegen kann. Hanna Hong danke ich als meine erste feste Begleiterin während der Promotion. Anna Glöckle danke ich für die perfekt abgestimmte Zusammenarbeit, sowie Christian Greunke, dass Du dir immer Zeit genommen hast, wenn ich Dich gebraucht habe.

Auch dem Arbeitskreis Piel danke ich für die herzliche Aufnahme in meiner Zeit als einzige Doktorandin und danach, ganz besonders hervorheben möchte ich: Dr. Christoph Kohlhaas, Dr. Mike Freeman, Dr. Brandon Morinaka, Ursula Steffens, Dr. Katja Jensen und Stefan Künne.

Ohne die Unterstützung meiner Familie wäre ich nie soweit gekommen. Danke, dass ihr nie an mir gezweifelt habt und mir die nötige Kraft gegeben habt. Euch gilt mein größter Dank.

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung	1
I.1.	Complestatin - Hintergrund und Stand der Forschung	5
I.2.	Strukturelle und biologische Eigenschaften von Complestatin (13)	6
I.3.	Chemische Totalsynthesen von Complestatin (13)	7
I.4.	Biosynthese von Complestatin (13)	12
II	Ergebnisse und Diskussion	17
II.1.	Festphasenpeptidsynthese	18
II.1.1.	SPPS zur linearen Complestatin-Vorstufe	20
II.1.2.	SPPS einer linearen Vorstufe des Arylomycin-Typs	37
II.2.	Flüssigphasenpeptidsynthese	43
II.2.1.	Peptidsynthese der linearen Vorstufe von Complestatin (13) in der Flüssigphase	43
II.2.2.	Peptidsynthese linearer Vorstufen von Complestatin-Derivaten	49
II.3.	Enzymatische Kupplungsreaktionen	54
II.3.1.	PCP-Beladungsexperimente	55
II.3.2.	Enzymatische Biaryl-Kupplungsexperimente	58
II.4.	Untersuchungen zur Halogenierung in der Complestatin-Biosynthese	61
II.4.1.	Synthese der potenziellen Substrate und Produkte	62
II.4.2.	Flavin-abhängige Halogenasen	64
II.4.3.	Aktivitätstest zu ComH und SsuE	65
II.4.4.	Halogenierungsassays	68
II.5.	Strukturaufklärung eines mutmaßlichen fluorierten Naturstoffes aus <i>Streptomyces</i> sp. TC1	70
II.6.	Zusammenfassung	74
II.7.	Summary	80
III	Experimenteller Teil	87
III.1.	Verwendete Apparaturen und Messgeräte	87
III.2.	Vektoren, Organismen und Primer	89
III.2.1.	Vektoren	89
III.2.2.	Organismen	89
III.2.3.	Primer	89
III.3.	Medien und Puffer	90
III.3.1.	Nährmedien für die Proteinexpression	90
III.3.2.	LB-Agar-Kulturplatten	90

III.3.3.	SOC-Medium (Super Optimal broth with Catabolite repression)	90
III.3.4.	Puffer für die Proteinaufreinigung	91
III.3.5.	Assaypuffer	91
III.3.6.	Antibiotika und Zusätze	92
III.4.	Mikro- und molekularbiologische Techniken	92
III.4.1.	Kultivierung von Bakterien	92
III.4.2.	Stammhaltung in Kryokulturen	92
III.4.3.	Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen	93
III.4.4.	Transformation	93
III.4.5.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	94
III.4.6.	Plasmidisolierung	95
III.4.7.	Restriktion (Testverdau)	95
III.5.	Proteinexpression und Proteinreinigung	96
III.5.1.	Proteinexpression - ComH	96
III.5.2.	Proteinexpression - SsuE	96
III.5.3.	Zellaufschluss	97
III.5.4.	Proteinreinigung	97
III.5.5.	Entsalzung und Aufkonzentrierung der Proteine	98
III.5.6.	Proteinkonzentrationsbestimmung	99
III.6.	Gelelektrophorese	100
III.6.1.	Agarose-Gelelektrophorese	100
III.6.2.	SDS-Gelelektrophorese	100
III.7.	Enzymatische Assays	102
III.7.1.	PCP-Ladeassay	102
III.7.2.	Biaryl-Kupplungsassay	103
III.7.3.	Aktivitätstests zu ComH und SsuE	104
III.7.4.	Halogenierungsassay	104
III.8.	Chromatographische Methoden	106
III.9.	Chemikalien	108
III.10.	Allgemeine Arbeitsvorschriften	108
III.11.	Allgemeine Arbeitsvorschriften für die SPPS	109
III.12.	Synthese der Bausteine für die SPPS	112
III.12.1.	<i>N</i> -Alloc-D-4-HPG (56)	112
III.12.2.	<i>N</i> -Alloc-3,5-dichlor-D-4-HPG (58)	113

III.12.3.	3-Chlor-D-4-HPG (60)	114
III.12.4.	3,5-Dichlor-D-4-HPG (23)	115
III.12.5.	2,6-Dichlor-4-iodphenol (67)	116
III.12.6.	(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoessigsäuremethylester (66)	117
III.12.7.	2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoessigsäure (16)	119
III.12.8.	D-Tryptophanmethylester (65)	120
III.12.9.	<i>N</i> -(2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoaceto)-D-tryptophanmethylester (64)..	121
III.12.10.	<i>N</i> -(2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoaceto)-D-tryptophan (59)	122
III.12.11.	<i>N-tert</i> -Butyloxycarbonyl-L-tyrosin (72).....	124
III.12.12.	(<i>S</i>)- <i>N-tert</i> -Butyloxycarbonyl-4-(4-Hydroxybenzyl)-1,3-oxazolidin-5-on (73).....	125
III.12.13.	<i>N</i> -Methyl-L-Tyrosin · TFA (74).....	126
III.12.14.	<i>N</i> -Methyl-L-Tyrosinmethylester HCl (118).....	127
III.12.15.	<i>N</i> -9-Flourenylmethoxycarbonyl-D-4-HPG (94)	128
III.12.16.	<i>N</i> -Boc-D-4-HPG (107)	129
III.12.17.	(<i>R</i>)- <i>N-tert</i> -Butyloxycarbonyl-4-(4-hydroxyphenyl)-1,3-oxazolidin-5-on (108)	130
III.12.18.	<i>N</i> -Me-D-4-HPG (109).....	131
III.12.19.	<i>N</i> -Alloc- <i>N</i> -Me-D-4-HPG (105).....	132
III.12.20.	Allyloxycarbonyl- <i>N</i> -succinimidester	133
III.13.	Versuchsdurchführungen zur SPSS	134
III.13.1.	Festphasensynthese zur linearen Complestatin-Vorstufe	134
III.13.2.	Festphasensynthese der linearen Arylomycin-Vorstufe	142
III.14.	Synthesevorschriften zur LPPS	145
III.14.1.	D-4-HPG-Methylester · HCl (17).....	145
III.14.2.	<i>N-tert</i> -Butyloxycarbonyl-3,5-dichlor-D-4-hydroxyphenylglycin (113)	146
III.14.3.	MeO-D-HPG-D-HPG-Cl ₂ -Boc (120).....	147
III.14.4.	MeO-D-HPG-D-HPG-Cl ₂ -NH ₂ (116)	148
III.14.5.	MeO-D-HPG-D-HPG-Cl ₂ -D-Trp-(2-(HP-Cl ₂)-2-oxoessigsäure) (121).....	149
III.14.6.	HO-D-HPG-D-HPG-Cl ₂ -D-Trp-(2-(HP-Cl ₂)-2-oxoessigsäure) (115)	150
III.14.7.	MeO-Me-L-Tyr-D-HPG-Cl ₂ -Boc (122).....	152
III.14.8.	HO- <i>N</i> -Me-L-Tyr-D-HPG-Cl ₂ -Boc (117).....	153
III.14.9.	MeO-D-HPG- <i>N</i> -Me-L-Tyr-D-HPG-Cl ₂ -Boc (123)	155
III.14.10.	MeO-D-HPG- <i>N</i> -Me-L-Tyr-D-HPG-Cl ₂ -NH ₂ (114)	156
III.14.11.	C-geschützte lineare Peptidvorstufe 124 von Complestatin (13)	157
III.14.12.	Lineare Peptidvorstufe 48 von Complestatin (13).....	158

III.14.13.	Complestatin-Derivat 137 : MeO-D-HPG-L-Tyr-Boc (129)	159
III.14.14.	Complestatin-Derivat 137 : MeO-D-HPG-L-Tyr-NH ₂ (130)	160
III.14.15.	Complestatin-Derivat 137 : MeO-D-HPG-L-Tyr-D-HPG-Boc (131)	161
III.14.16.	Complestatin-Derivat 137 : MeO-D-HPG-L-Tyr-D-HPG-NH ₂ (132)	162
III.14.17.	Complestatin-Derivat 137 : MeO-D-HPG-D-HPG-Boc (133)	163
III.14.18.	Complestatin-Derivat 137 : MeO-D-HPG-D-HPG-NH ₂ (134)	164
III.14.19.	Complestatin-Derivat 137 : Tetrapeptid-OMe (135)	165
III.14.20.	Complestatin-Derivat 137 : Tetrapeptid-OH (136)	166
III.14.21.	Complestatin-Derivat 137	168
III.14.22.	Complestatin-Derivat 128 : L-Tyrosinmethylester (138)	169
III.14.23.	Complestatin-Derivat 128 : MeO-L-Tyr-Gly-Boc 140	170
III.14.24.	Complestatin-Derivat 128 : MeO-L-Tyr-Gly-NH ₂ 141	171
III.14.25.	Complestatin-Derivat 128 : N-Boc-D-Trp 142	171
III.14.26.	Complestatin-Derivat 128 : MeO-Gly-D-Trp-Boc 143	172
III.14.27.	Complestatin-Derivat 128 : HO-Gly-D-Trp-Boc 144	173
III.14.28.	Complestatin-Derivat 128 : MeO-D-HPG-Gly-D-Trp-Boc 145	174
III.14.29.	Complestatin-Derivat 128 : HO-D-HPG-Gly-D-Trp-Boc 146	175
III.14.30.	Complestatin-Derivat 128 als Methylester 147	176
III.14.31.	Complestatin-Derivat 128	178
III.15.	Aktivierung durch Thioesterbildung	179
III.15.1.	Aktivierung des Tetrapeptids 115 als Phenylthioester 149	179
III.15.2.	S-Phenylthioacetat	180
III.16.	Synthese der Substrate und der Referenz-substanzen für die Halogenierungsassays ...	181
III.16.1.	(4-Hydroxyphenyl)-2-oxo-essigsäuremethylester (159)	181
III.16.2.	2-(4-Hydroxyphenyl)-2-oxo-essigsäure (46)	182
III.16.3.	2-(4-Hydroxyphenyl)-2-oxo-ethylthiolsäure-2-acetamido-ethylester (157)	183
III.16.4.	2-(tert-Butoxycarbonylamino)-3-(4-hydroxyphenyl)propyl-thiolsäure-2-acetamido-ethylester (160)	184
III.16.5.	2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propylthiolsäure-2-acetamido-ethylester (154)	185
III.16.6.	2-(4-Hydroxyphenyl)-2-hydroxy-ethylthiolsäure-2-acetamido-ethylester (156)	186
III.16.7.	3,5-Dichlor-L-tyrosin (151)	187
	Literaturverzeichnis	187
	Abkürzungsverzeichnis	195

I EINLEITUNG

Die Anwendung von Naturstoffen als Heilmittel zur Behandlung verschiedenster Krankheiten führt Jahrtausende zurück in die Geschichte der Menschheit. In Mesopotamien wurden natürliche Wirkstoffe bereits 2600 vor unserer Zeitrechnung zur Heilung von Husten, Erkältungen, Infektionen oder Fieber eingesetzt.¹ 1500 v.Chr. wurden im Papyrus Ebers über 700 Medikamente, meist pflanzlicher Herkunft, aufgelistet. Auch in China und Indien kann der medizinische Einsatz pflanzlicher und tierischer Extrakte auf über 1000 Jahre v. Chr. zurückverfolgt werden.^{2,3} Im europäischen Raum wurde die heilende Wirkung von Naturstoffen ebenfalls entdeckt. Die Araber übernahmen die Aufgabe der Dokumentation der europäischen Kenntnisse und erweiterten diese um ihr eigenes Wissen.² Bereits vor der Entwicklung von modernen chemischen und biotechnischen Synthesewegen zu medizinisch relevanten Substanzen wurden also die Ressourcen der Natur als Medizin genutzt. Anfang des 19ten Jahrhunderts konnten pflanzliche Wirkstoffe, welche bereits vor Jahrtausenden als Heilmittel genutzt wurden und heilende, fiebersenkende oder schmerzlindernde Wirkung aufweisen, erstmals in reiner Form isoliert und in der pharmazeutischen Industrie produziert und eingesetzt werden.⁴ Einen ersten Meilenstein stellt das narkotische und schmerzlindernde Morphin (**1**) aus der Klasse der Benzylisochinolin-Alkaloide dar (Abbildung I-1). Nach der Isolierung durch Sertürner aus dem Schlafmohn *Papaver somniferum* in 1806 wurde Morphin (**1**) zum ersten kommerziell produzierten reinen Naturstoff, eingeführt 1826 durch E. Merck.^{4,5} Im Jahr 1899 wurde Aspirin (**2**), abgeleitet von dem analgetischen Naturstoff Salicin (**3**) aus der Weidenrinde, als Schmerzmittel von Bayer vermarktet.⁶



Abbildung I-1. Strukturen der ersten kommerziell erhältlichen Naturstoff-abgeleiteten Wirkstoffe Morphin (**1**) und Aspirin (**2**) sowie der Aspirin-Vorstufe Salicin (**3**).

Ein weiterer Meilenstein in der Medizin, Flemings Entdeckung des antibiotischen Penicillins aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* in 1928 und dessen therapeutisch vielseitige Anwendungsmöglichkeiten erschlossen durch Chain und Florey in 1938, war der Antrieb, die Natur auf neuartige mikrobielle Wirkstoffe zu erforschen.⁷ Zudem werden seit den frühen 1970er Jahren auch die Ozeane, die 70 % unserer Erdoberfläche einnehmen und damit eine unerschöpfliche Quelle für potenziell bioaktive Wirkstoffe darstellen, hinsichtlich medizinisch relevanter Sekundärmetabolite

intensiv untersucht.^{1,8,9} Entdeckt wurden dabei unter anderem die antitumorale Bryostatine, z. B. Bryostatin 1 (**4**), und das antileukämisch wirkende Sorbicillacton A (**5**, Abbildung I-2).^{10,11}

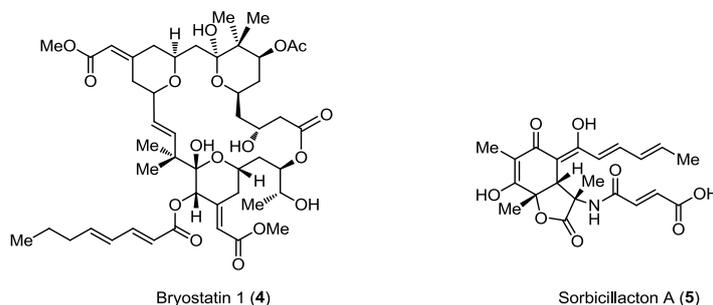


Abbildung I-2. Die anticancerogenen Sekundärmetabolite Bryostatin 1 (**4**) und Sorbicillacton A (**5**).

Die besondere Rolle von Naturstoffen in der Entwicklung vielfältiger Pharmazeutika wird durch die Analysen von Newman, Cragg und Snader deutlich hervorgehoben.¹²⁻¹⁵ Ihre Arbeiten zeigen, dass bioaktive Naturstoffe im Verlauf der Geschichte der Wirkstoffforschung und -entwicklung nicht an Bedeutung verloren haben. Durch den Fortschritt in chemischen und biologischen Synthesemöglichkeiten und die sehr große Bandbreite potentieller Wirkstoffe ist der Zugang zu vielversprechenden Heilmitteln über multidisziplinäre Annäherung nahezu uneingeschränkt.¹⁻¹⁸

Die strukturell oft sehr komplexen Sekundärmetaboliten produziert die Natur faszinierenderweise aus einfachen Grundbausteinen mittels Biokatalysatoren.¹⁹ Besonders anspruchsvolle und bemerkenswerte Strukturmerkmale weisen Verbindungen auf, die Biaryl- und/oder Biarylether-Bindungen enthalten. Biaryl-Verbindungen sind in vielen Naturstofffamilien aus unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft vertreten und bilden eine große Anzahl medizinisch bedeutsamer Sekundärstoffe. Die chemisch nur sehr schwer zugänglichen Biaryl- und Biarylether-Bindungen werden in der Natur von oxidativen Enzymen, wie Cytochrom-P450 (CYP450) -Oxygenasen, Laccasen oder Peroxidasen, über eine radikalisch-oxidative Kupplung generiert.²⁰ Das sedative und angstlösende Magnoflorin (**6**), das antitumorale Streptonigrin (**7**), der Anti-Malaria Wirkstoff (+)-Knipholon (**8**) sowie die pharmazeutisch vielseitigen Ellagitannine, wie das Cornusiin E (**9**), sind nur eine kleine Auswahl (Abbildung I-3).²⁰

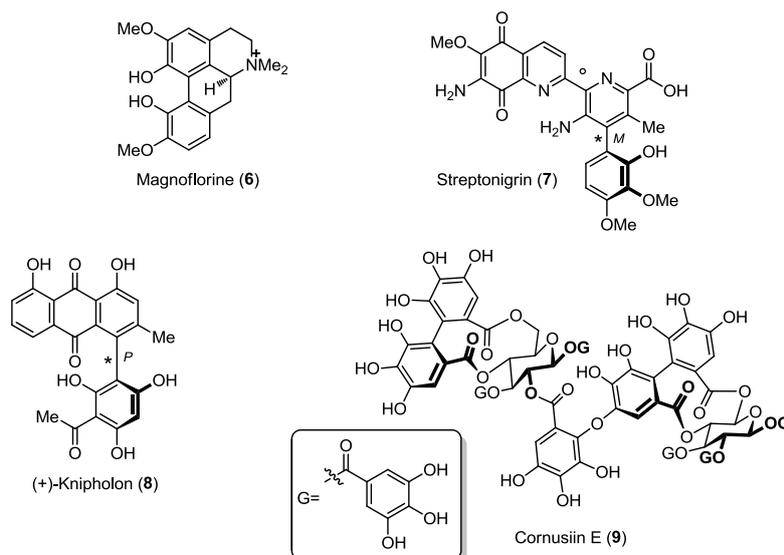


Abbildung I-3. Einige Beispiele pharmazeutisch bedeutender Biaryl-Naturstoffe **6 - 9**.

Weitere wichtige Beispiele sind die antibiotischen Naturstoffe Vancomycin (**10**), Teicoplanin (**11**) und Arylomycin (**12**, Abbildung I-4).^{21,22} Sie gehören zu der Naturstoffklasse der Peptid-basierten Metabolite, welche von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) produziert werden.²³ Im Fall der Vancomycin- und Teicoplanin-Antibiotikafamilien konnten Walsh *et al.* aufklären, dass das starre, kelchförmige Aglykon-Gerüst, hervorgerufen durch die Biaryl- und Biarylether-Brücken, verantwortlich für die antibiotische Aktivität dieser Naturstoffe ist. Nachdem in der Biosynthese CYP450-Enzyme die flexible lineare Peptidkette durch oxidative Phenolkupplung in rigide Makrozyklen überführen, können die Vancomycin- und Teicoplanin-artigen Verbindungen über Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen den Aufbau der bakteriellen Zellwand verhindern.²⁴ Die konkave Architektur von Vancomycin (**10**) begünstigt die Ausbildung von fünf Wasserstoffbrücken zwischen der Vancomycin-Struktur und den Pentapeptidoglykanketten der Zellwand von gram-positiven Bakterien. Damit blockiert **10** effektiv die Peptidoglykan-Zellwandbiosynthese der Bakterien.²⁵ Während Vancomycin-artige Antibiotika durch Störung der bakteriellen Zellwandbiosynthese ihre Wirkung entfalten, hemmen die Arylomycin-Lipopeptide bakterielle Signalpeptidasen des Typs I.²⁶ Paetzl *et al.* konnten über kristallographische und biophysikalische Analyse die Wechselwirkung zwischen Arylomycin A2 (**12**) und der *Escherichia coli* Signalpeptidase I aufklären. Arylomycin A2 (**12**) blockiert das aktive Zentrum der Signalpeptidase I, wobei die Aryl-Aryl-Brücke in die Bindungstasche des Enzyms ragt und über alle vorhandenen Wasserstoff-Donor- und Akzeptor-Gruppen nicht-kovalent an die katalytisch aktiven Aminosäuren bindet.^{26,27} Die Biaryl-Bindung liegt während des Bindungszustandes ausschließlich in der *P*-Konfiguration vor, was auf die besondere Bedeutung der Geometrie an der Biaryl-Bindung hinweist.²⁸

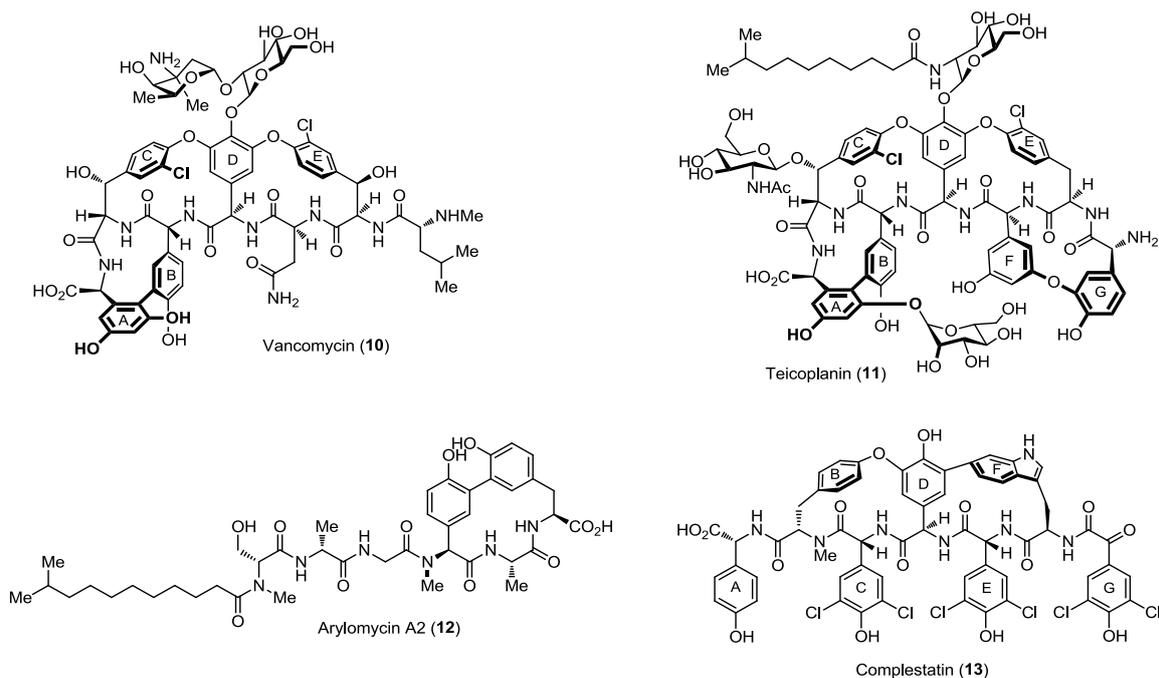


Abbildung I-4. Strukturformeln von Vancomycin (**10**), Teicoplanin (**11**), Arylomycin A2 (**12**) und Complestatin (**13**).

Die vorliegende Arbeit befasst sich insbesondere mit der chemo-enzymatischen Totalsynthese des antiviralen Complestatins (**13**), welches zu der Naturstoffklasse der nicht-ribosomalen BEPs (Biaryl- und Biarylether-Kupplungen enthaltende Peptide) zählt. Das angestrebte Ziel dabei ist die Entwicklung einer effizienten Synthesestrategie zur linearen Peptidkette des Complestatin-Typs, um eine leichte Zugänglichkeit zu diesem medizinisch vielfältig einsetzbaren Naturstoff und zu vereinfachten Derivaten zu ermöglichen. Ferner sollte der Zeitpunkt der Chlorierung in der Biosynthese von **13** ermittelt sowie auch ein erster Zugang zu Peptidvorstufen für eine Synthese der Arylomycine erarbeitet werden. Daraus ergaben sich folgende Schwerpunkte für diese Arbeit:

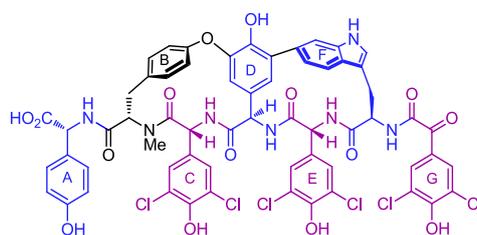
- Chemische Synthese der linearen Peptidvorstufe von **13** mittels Festphasenpeptidsynthese (engl. Solid Phase Peptide Synthesis, kurz: SPPS),
- Chemische Synthese der linearen Peptidvorstufe eines Arylomycin-A2-Derivates mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS),
- Chemische Synthese der linearen Peptidvorstufe von **13** und vereinfachte Derivate mittels Flüssigphasenpeptidsynthese (engl. Liquid Phase Peptide Synthesis, kurz: LPPS),
- Makrozyklisierung der Peptidvorstufen über enzymatische Oxidation,
- Aufklärung des Halogenierungsschrittes in der Biosynthese des in **13** enthaltenen 3,5-Dichlor-4-D-hydroxyphenylglycins.

I.1. Complestatin - Hintergrund und Stand der Forschung

Die komplexen Strukturen und vielversprechenden biologischen Aktivitäten der Biaryl-Peptide machen sie auch für die chemische Totalsynthese zu lohnenswerten Zielmolekülen. Der Aufbau der Biaryl- und Biarylether-Bindungen dieser Substanzen gestaltet sich jedoch synthetisch sehr schwierig. Zum Erzielen akzeptabler chemischer und optischer Ausbeuten in den Kupplungsschritten werden bisher vorfunktionalisierte Aminosäurebausteine in die synthetischen Zwischenstufen eingebaut, die spätere regio- und stereoselektive Quervernetzungen möglich machen sollen. Dies führt zu teilweise langen und umständlichen Synthesewegen unter Verwendung einer Vielzahl orthogonaler Schutzgruppen. In der Biosynthese dieser Naturstoffe erfolgt der Aufbau des Biaryl-Strukturelements durch oxidative Biaryl- und/oder Biarylether-Kupplungen hoch selektiv, ausgehend von einfachen Bausteinen.²⁰ Genetische Informationen zu den Biosynthesewegen mehrerer BEPs lassen annehmen, dass diese Biotransformationen durch individuelle CYP450-Enzyme ausgeführt werden.²⁹⁻³⁶ Bestätigungen für diese Annahme lieferten *in vivo* Studien an Verbindungen des Balhimycin- und Teicoplanin-Typs.³⁷⁻⁴³ Stegmann, Süßmuth und Wohlleben *et al.* zeigten hier, dass die CYP450-Enzyme OxyA, OxyB und OxyC für die Biaryl- bzw. Biarylether-Kupplungen in der Balhimycin-Biosynthese verantwortlich sind.³⁸ OxyB führt den Arbeiten von Robinson *et al.* zufolge die Biaryl-Verknüpfung des C-D-Fragments in der Vancomycin-Biosynthese durch (die Aglycon-Strukturen von Vancomycin (**1**) und Balhimycin sind identisch). Es ist das erste an der Biosynthese von nicht-ribosomalen Peptiden beteiligte Kupplungsenzym, das mittels *in vitro* Experimenten analysiert wurde.^{38,44} Kürzlich veröffentlichte Arbeiten von Cryle *et al.* zeigten, dass die an der PCP₇-X-Domäne gebundene lineare Aglycon-Vorstufe des Teicoplanin-Typs von OxyB zusammen mit OxyA zum C-D-E-Bizyklus umgesetzt wird und bewiesen damit das von Bischoff *et al.* formulierte Postulat, dass OxyA in der Biosynthese für die Knüpfung der Biarylether-Brücke zwischen den aromatischen Systemen D-E verantwortlich ist.^{45,42} Die Versuche von Robinson *et al.* klärten auf, dass der enzymatische Kupplungsschritt lediglich mit linearen Peptidvorstufen funktioniert, die über eine Thioester-Bindung an ein sogenanntes Peptidylträgerprotein (engl. Peptidyl-Carrier-Protein, kurz: PCP) gebunden sind. Die vorliegende Arbeit wird sich mit der Synthese der linearen Peptidvorstufen des Complestatins (**13**), deren Aktivierung durch Derivatisierung mit organischen Thiolen als vereinfachte Thiotemplate (Coenzym A oder *N*-Acetylcysteamin), sowie der chemo-enzymatischen Biaryl- und Biarylether-Bindungsknüpfung mittels heterolog produzierter Biokatalysatoren beschäftigen. Die entwickelte Methodik wird schließlich zur Generierung neuartiger antiinfektiver Wirkstoffe des Complestatin-Typs angewandt werden.

I.2. Strukturelle und biologische Eigenschaften von Complestatin (13)

Complestatin (**13**) wurde erstmals 1980 von Kaneko *et al.* aus dem Myzel von *Streptomyces lavendulae* isoliert (Abbildung I-5).⁴⁶ Die Strukturaufklärung mittels UV- und Kernresonanz (NMR)-Spektrometrie sowie saurer Hydrolyse führte zu der komplexen makrozyklischen Strukturformel, die zum größten Teil aus aromatischen D-Aminosäuren aufgebaut ist. Auffallend sind zudem die drei Chlor-substituierten aromatischen Reste.^{47,48,50}



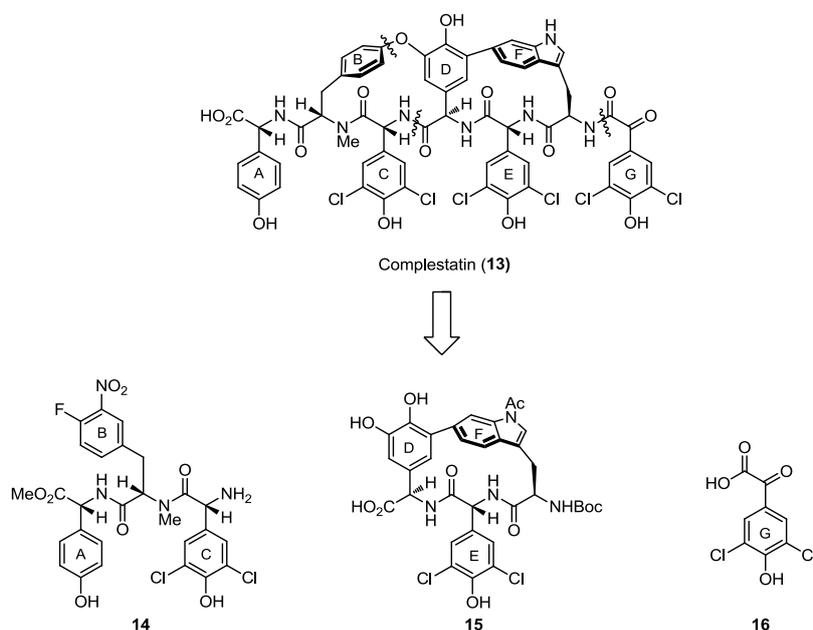
Complestatin (**13**)

Abbildung I-5. Der antiinfektive Wirkstoff Complestatin (**13**). Schwarz: proteinogene Aminosäuren; blau: nicht-proteinogene Aminosäuren; violett: nicht-proteinogene, chlorierte Aminosäuren.

Als ein Hemmstoff des humanen alternativen Komplementsystems wurde **13** eine bedeutende Rolle zugewiesen, da sich bei einigen Autoimmunerkrankungen wie Lupus, Glomerulonephritis und anaphylaktischer Schock das Komplementsystem nachteilig auswirkt. Hemmstoffe des Komplementsystems sind in der Lage allergische Reaktionen abzuschwächen.^{48,49} Unter den pharmazeutischen Wirkstoffen, die das menschliche Komplementsystem beeinflussen, erwies sich **13** als der effizienteste Hemmstoff.⁵⁰ 1991 wurde zudem der antivirale Effekt von **13** gegenüber dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) erforscht.⁵¹ Durch das Blockieren der Bindung zwischen den CD4-Rezeptoren der humanen Wirtszelle und dem Glykoprotein gp120 an der Oberfläche des HI-Virus unterbricht **13** den Eintritt des Virus in die Zelle.⁵²⁻⁵⁴ Weitere medizinisch relevante Eigenschaften des Complestatins (**13**) sind zum einen dessen anti-apoptotische⁵⁵ und Excitotoxizitätshemmende⁵⁶ Wirkung. Zum anderen unterstützt **13** die Fibrinolyseaktivität.⁵⁷ Trotz der strukturellen Verwandtschaft zu den Vancomycin-Typ-Antibiotika konnte für Complestatin (**13**) lange keine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden.^{48,50} Jüngste Arbeiten von Kim *et al.* zeigten jedoch, dass es gegenüber gram-positiven Bakterien, unter anderem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*, durch Beeinflussung der Fettsäuresynthese induzierte antibakterielle Aktivität aufweist.⁵⁸ Die medizinisch äußerst vielversprechenden Merkmale und die strukturelle Komplexität erweckten großes Interesse zur Entwicklung von totalsynthetischen Zugängen zu **13**.

I.3. Chemische Totalsynthesen von Complestatin (13)

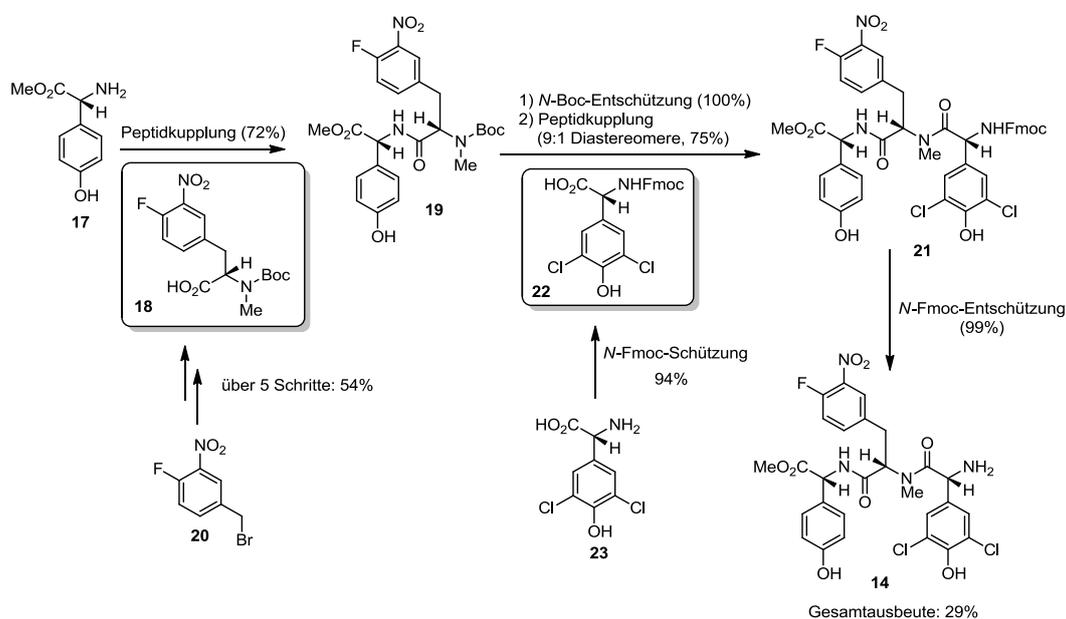
Eine schrittweise Annäherung an eine erste Totalsynthese von **13** wurde in vielen totalsynthetisch arbeitenden Gruppen durch die Synthese eines Molekülteils, dem DEF(G)-Ringsystem, angestrebt.⁵⁹⁻⁶⁶ Nachdem die ersten Versuche, den Ost-Ring über Makrolactonisierung, Palladium-katalysierte Suzuki-Miyaura- oder Stille-C-C-Kupplung aufzubauen, lediglich lineare Vorstufen bzw. vereinfachte Ringsysteme lieferten,^{59,61-65} wurde der erste strukturell komplette, rechte Zyklus von **13** 2007 von Zhu *et al.* mittels Peptid- und Suzuki-Kupplung synthetisiert. Die *P*-Konfiguration der axial-chiralen Biaryl-Bindung zu generieren und dabei die korrekte Stereochemie der Aminosäurebausteine in der linearen Peptidkette beizubehalten erwies sich als große Herausforderung.⁶⁶ Letztendlich führten nach den Totalsynthesen des Isocomplestatins und Chloropeptin I durch Hoveyda *et al.*^{67,68} die Forschungen von Boger *et al.*^{69,70} als auch von Zhu *et al.*⁷¹ zur chemischen Totalsynthese von Complestatin (**13**). Für die chemische Totalsynthese haben Boger *et al.* **13** retrosynthetisch in drei Fragmente unterteilt. Während Fragmente **14** und **15** Tripeptide darstellen, besteht Fragment **16** aus einer aromatischen Ketosäure (Schema I-1).



Schema I-1. Retrosynthetische Darstellung der Totalsynthese des Complestatins (**13**) nach Boger *et al.*⁶⁹

In der ersten Variante der Totalsynthese⁶⁹ verwendeten Boger *et al.* als Ausgangsstoff der Synthese von Fragment **14** D-4-Hydroxyphenylglycinmethylester (**17**), welches im ersten Schritt mit dem *N*-Boc-*N*-Methyl-L-Phenylalanin-Derivat **18** mittels Peptidkuppelungschemie zum Dipeptid **19** umgesetzt wurde (Schema I-2). Hierfür wurde das Phenylalanin-Derivat **18** in fünf Schritten und einer Ausbeute von 54 % aus 3-Nitro-4-Fluorobenzylbromid (**20**) gewonnen. Das nach der *N*-Boc-Entschützung des

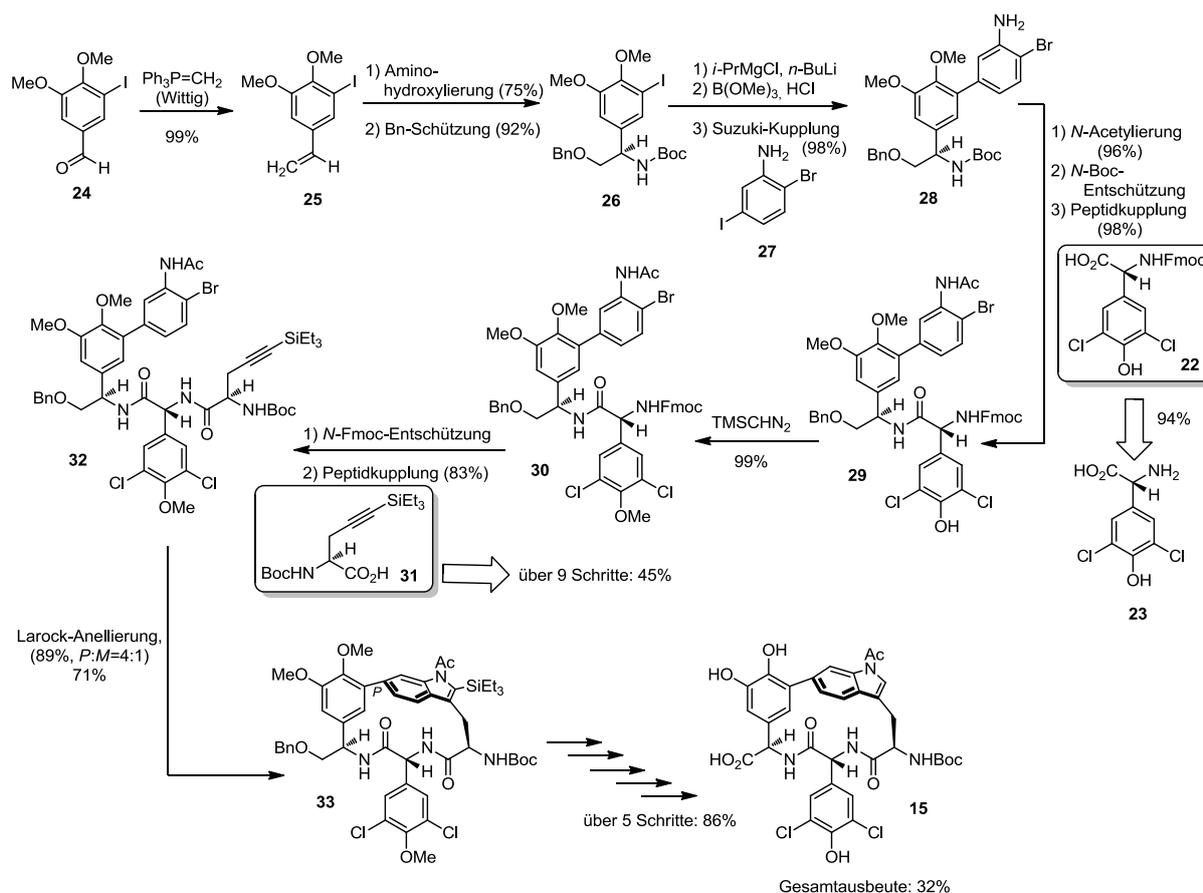
Dipeptid **19** für die Kupplung zum Tripeptid **21** benötigte *N*-Fmoc-geschützte und dichlorierte D-4-Hydroxyphenylglycin (4-HPG) **d-22** wurde aus 3,5-Dichlor-D-4-HPG (**d-23**) hergestellt. Eine *N*-Fmoc-Entschützung von **21** führte schließlich zu Fragment **14**. Ausgehend von **20** wurde **14** somit in neun Schritten mit 29 % Gesamtausbeute erhalten.



Schema I-2. Syntheseweg zu Fragment **14** der Totalsynthese des Complestatins (**13**) nach Boger *et al.*⁶⁹

Fragment **15** ist der Teil, welcher die axial-chirale Biaryl-Bindung sowie den Indolring enthält. Eine atropselektive Bildung der Biaryl-Brücke koordiniert mit der Anellierung des Indolringes ist mit Hindernissen verbunden. Mehrere orthogonale Schützungen von Seitengruppen als auch Funktionalisierungen mussten zu diesem Zweck realisiert werden. Die Sequenz startete mit einer Wittig-Reaktion, über welche der Benzaldehyd **24** zum Styrol **25** umgesetzt wurde (Schema I-3). Eine asymmetrische Aminohydroxylierung und die anschließende Benzyl-Schützung der neu gebildeten Hydroxygruppe lieferten das *O*- und *N*-geschützte Aminohydroxybenzol **26**. Um eine Suzuki-Kupplung zu ermöglichen, wurde das Aryliodid **26** zur Boronsäure konvertiert und dem folgend mittels Suzuki-Kupplung mit 2-Bromo-5-iodoanilin (**27**) die noch frei rotierbare Biaryl-Verbindung **28** hergestellt. Nach Acetylierung der Aminofunktion des Anillinrestes von **28** und *N*-Boc-Entschützung wurde durch Kupplung mit der Aminosäure **22** das Dipeptid **29** gebildet. Die Generierung des Tryptophan-Restes im Tripeptid **33** setzte die *O*-Schützung der einzigen bisher unfunctionalisierten Hydroxygruppe voraus, um anschließend in Verbindung **30** die Aminosäure **31** mit dem Triethylsilylalkin-Rest einzuführen, welcher für die Anellierung zum Indolsystem benötigt wurde. Die Herstellung des Triethylsilylalkin-Bausteines erfolgte über neun Stufen und in einer Gesamtausbeute von 45 %. Das lineare Tripeptid **32** wurde dann über eine Larock-Anellierung in guter Atropselektivität mit einem

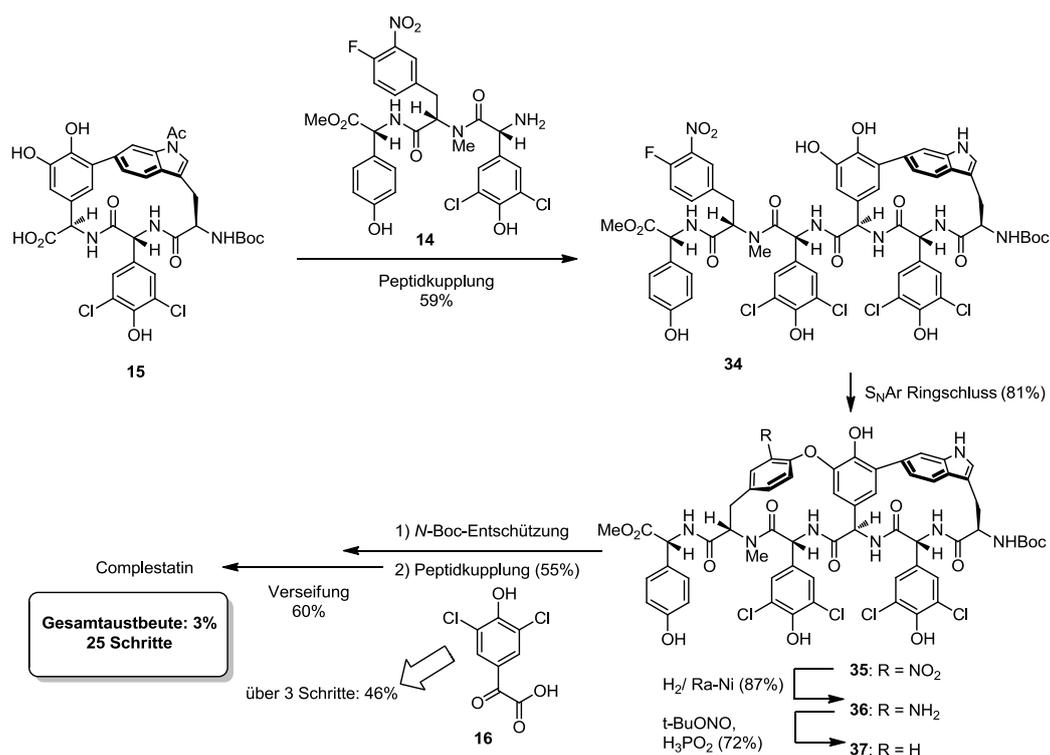
P/M-Verhältnis von 4:1 zugunsten der gewünschten *P*-Konfiguration zyklisiert, wobei die *P*-Form nach Isolierung in 71 % iger Ausbeute erhalten wurde. Die Larock-Indol-Zyklisierung ist hierfür eine ausgezeichnete Synthesestrategie. Zum einen ist aufgrund der sterisch anspruchsvollen Triethylsilyl-Gruppe die erwünschte Regioselektivität des gebildeten Fünfringes gewährleistet. Zum anderen wird bevorzugt die im Naturstoff **13** enthaltene Konfiguration der Biaryl-Achse erhalten. Die Befreiung der Alkoholate von den Schutzgruppen lieferte schließlich nach fünf weiteren Schritten Fragment **15**. Damit wurde Intermediat **24** in 18 Schritten und in einer Gesamtausbeute von 32 % zu **15** umgesetzt.



Schema I-3. Syntheseweg zum Fragment **15** der Totalsynthese des Complestatins (**13**) nach Boger *et al.*⁶⁹

Der Ketosäurebaustein **16** wurde in einer dreistufigen Synthese mit einer Ausbeute von 46 % hergestellt (nicht gezeigt). Die drei Fragmente **14**, **15** und **16** wurden anschließend mittels Peptidkupplungschemie verbunden und die Biarylether-Brücke aufgebaut. Im ersten Kupplungsschritt wurden **14** und **15** zusammengefügt, um das Hexapeptid **34** zu erhalten (Schema I-4). Bevor das dritte Fragment angefügt wurde, wurde die Biarylether-Bindung über eine intramolekulare nukleophile Substitution am Aromaten (S_NAr) zu Bizyklus **35** installiert. Nach der Reduktion und Entfernung der Nitrogruppe (**35** → **37**) wurde über einen letzten Kupplungsschritt Baustein **16** eingeführt. Eine anschließende Verseifung der Methoxyschutzgruppe führte schließlich zum

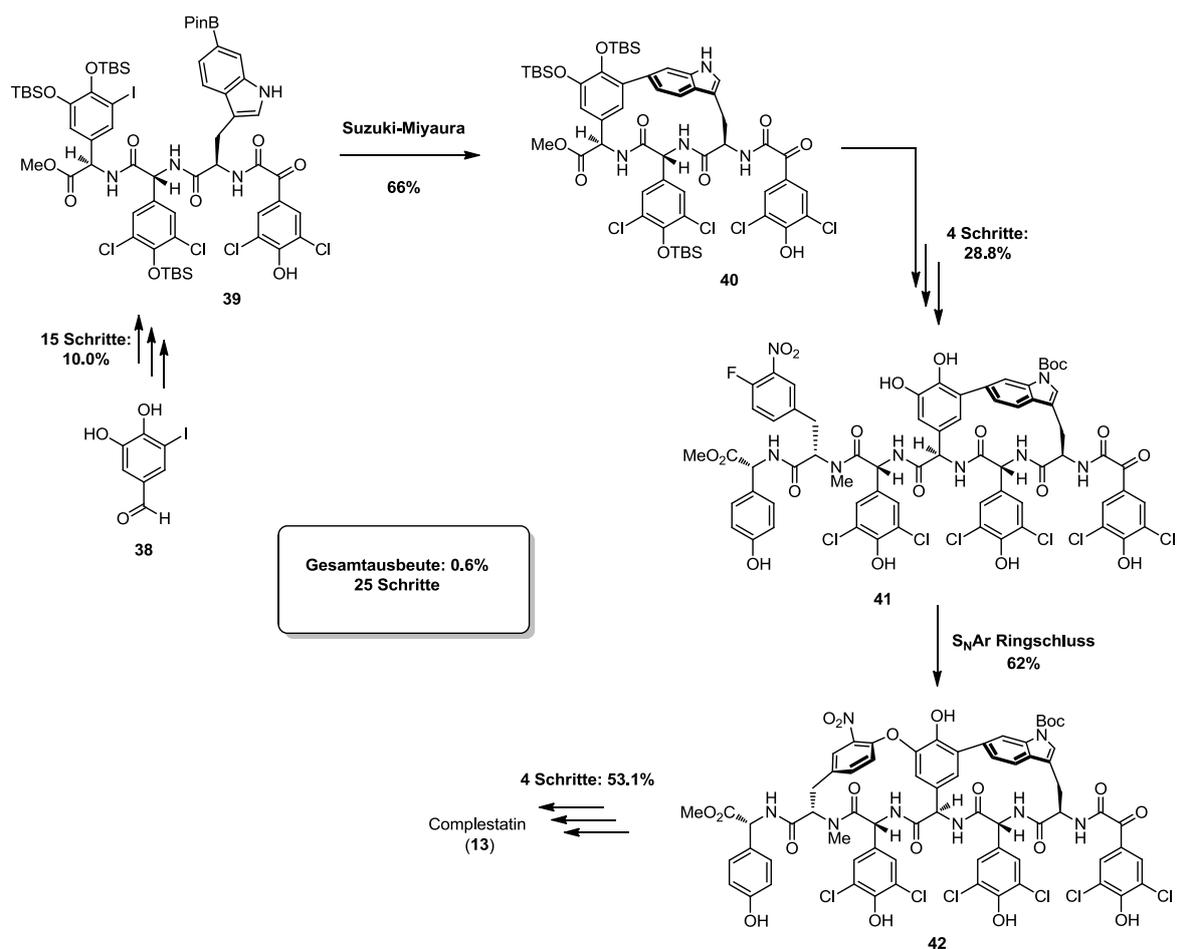
Complestatin (**13**). Die längste lineare Synthesesequenz der von Boger *et al.* entwickelten Totalsynthese besteht aus 25 Schritten und ergibt eine Gesamtausbeute von nur 3 %. Dabei ist erwähnenswert, dass insgesamt unter Beachtung der Herstellung der einzelnen Bausteine eine 46-stufige Synthesearbeit geleistet wurde. Wissenswert ist auch, dass sich bei Einbezug der Synthese von **14** eine Gesamtausbeute von 0.9 % ergibt. Boger *et al.* publizierten eine zweite, verbesserte Totalsynthese.⁷⁰ Der Hauptunterschied der zweiten Syntheseroute bestand in der Reihenfolge der Zyklisierungsreaktionen (Larock-Anellierung und S_NAr). Die intramolekulare S_NAr erfolgte als erster Zyklisierungsschritt mit einer Verbesserung der Ausbeute der Zyklisierung von 81 % auf 95 %. Die Larock-Indol-Zyklisierung wurde nach der S_NAr und somit an einer längeren Peptidkette durchgeführt, was zu einer Verringerung der Ausbeute der Anellierung führte. Die Atropselektivität wurde jedoch von 4:1 auf >20:1 (P:M) erhöht. Die extensiven Versuche die Totalsynthese zu verbessern, erbrachten eine Steigerung der Gesamtausbeute um lediglich 1 % auf 4 %. Dies zeigt deutlich die Komplexität einer Totalsynthese des Complestatins (**13**) auf rein chemischem Weg.



Schema I-4. Bildung von Complestatin (**13**) aus den drei Fragmenten **14**, **15** und **16** nach Boger *et al.*⁶⁹

Eine weitere Synthesestrategie wurde von Zhu *et al.* entwickelt.⁷¹ Auch hier stellten Regio- und Stereo-Selektivität die größten Herausforderungen an das synthetische Gesamtkonzept. Um diese zu bewältigen, mussten mehrere Vorfunktionalisierungen durchgeführt und auch Schutzgruppen eingesetzt werden. Als Startsubstanz wurde 3,4-Dihydroxy-5-iodobenzaldehyd (**38**) verwendet. Aus diesem wurde nach 15 Reaktionsschritten die aus vier Aminosäure-Bausteinen bestehende

Verbindung **39** hergestellt, die die intramolekulare Bildung der axial chiralen Biarylbindung zwischen dem C-terminalen HPG-Baustein und dem Tryptophan-Rest ermöglichen sollte. Die intramolekulare Suzuki-Miyaura C-C-Kupplung lieferte **40** in einer Ausbeute von 66 %. Zhu *et al.* stellten fest, dass die Atropselektivität der Suzuki-Miyaura-Kupplung stark Substrat-abhängig ist. Um die gewünschte natürliche *P*-Konfiguration erhalten zu können, ist eine azyklische Zwischenstufe, wie das Tetrapeptid **39**, nötig. Eine zyklische Form, in der bereits die Biarylether-Brücke generiert wurde, lieferte für die Pd-katalysierte C-C-Kupplung die *M*-Konfiguration der Biaryl-Bindung, wie auch Hoveyda *et al.* zeigen konnten.^{72,67} Das zyklische Peptid-Fragment **40** wurde anschließend um drei weitere Bausteine zu **41** erweitert. Die Biarylether-Brücke in **42** wurde analog zur Synthese von Boger *et al.* mittels einer intramolekularen S_NAr aufgebaut. Das bityklische Peptid **42** lieferte schließlich nach einigen Entschützungs- und Defunktionalisierungsschritten das gewünschte Complestatin (**13**, Schema I-5). Die gesamte Totalsynthese von Complestatin (**13**) nach Zhu *et al.* erbrachte über die längste lineare Sequenz von 25 Reaktionsschritten eine Gesamtausbeute von 0.6 %.



Schema I-5. Totalsynthese von Complestatin nach Zhu *et al.*⁷¹

Die hier gezeigten, beiden einzigen bisher bekannten, stereoselektiven Totalsynthesen des Naturstoffes Complestatin (**13**) beweisen mit ihrer großen Zahl linearer Reaktionsabfolgen und der daraus resultierenden sehr geringen Ausbeuten, die einen Bereich um 0.6 % bzw. 4 % umfassen, welche enormen chemischen Herausforderungen bei der Darstellung dieses exklusiven Sekundärmetaboliten überwunden werden müssen. Bemerkenswerterweise ist die Biosynthese des Complestatins (**13**) im Vergleich zu den synthetischen Ansätzen hoch effizient.

I.4. Biosynthese von Complestatin (13)

In Organismen entstehen Aminosäure-basierte Metabolite vor allem ribosomal. Die in der DNA (Desoxyribonukleinsäure) kodierte genetische Information zur Struktur solcher Peptide wird mittels Ribonukleinsäuren (RNA) an das Ribosom vermittelt. Dort erfolgt die direkte Übersetzung des RNA-Codes in die Aminosäuresequenz. Dabei sind in der genetischen Information nur proteinogene Aminosäuren kodiert.⁷³ Die Proteinbiosynthese umfasst zudem auch einen nicht-ribosomalen Syntheseweg mittels multifunktionaler Enzyme, den NRPS.⁷⁴ Viele Mikroorganismen nutzen diese Multienzymkomplexe, um ein großes Repertoire strukturell komplexer, vielfältiger und biologisch aktiver Peptide herzustellen.^{75,76} NRPS können sowohl die 22 proteinogenen Aminosäuren, als auch ein riesiges Arsenal nicht-proteinogener Aminosäuren und Arylsäuren als Bausteine für die Kettenverlängerung nutzen.⁷⁷ Die multimodularen Enzymkomplexe umfassen für jeden einzubauenden Aminosäurebaustein ein Modul, welches wiederum aus individuellen katalytischen Domänen aufgebaut ist.^{75,77} Ein minimales Elongationsmodul besteht aus einer Adenylierungs- (A), einer Kondensations- (C) und einer Thiolierungs-Domäne (T, auch PCP für Peptidyl-Carrier-Protein). Diese sind für Substraterkennung und Aktivierung (A), die Bildung der Peptidbindung (C) sowie für die Bindung der wachsenden Peptidkette an die Synthetase (T) verantwortlich.^{77,78} Die T-Domäne wird dafür posttranslational modifiziert. Katalysiert durch eine Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) wird unter Verbrauch von Coenzym A (CoA) ein Phosphopantetheinyl-Arm (Ppant) an einen Serin-Rest im aktiven Zentrum von T angehängt.⁷⁹ Nur in dieser aktivierten Form kann die T-Domäne Aminosäuren bzw. wachsende Peptidketten kovalent an die endständige freie Thiolfunktion des langen, beweglichen Ppant-Armes binden und die Zwischenstufen zu den verschiedenen katalytischen Zentren transportieren.^{74,78,80} A-Domänen erkennen in der Regel L-Aminosäuren als Substrat. Epimerisierungs-Domänen (E) wandeln L-Aminosäuren vor Kettenverlängerung in die D-Konfiguration um. N-Methylierungen erfolgen mittels N-Methylierungs-Domänen (M).^{80,24} Sogenannte Tailoring-Enzyme dienen zusätzlich zur Modifikation der Produkte. Dazu zählen unter anderem Halogenasen, welche Halogenide (vor allem Chlor und Brom) einführen.⁸¹ Zyklisierungen

können von unterschiedlichen Enzymen durchgeführt werden.²⁴ Besondere Beispiele sind die für die oxidative Biaryl- und Biarylether-Bindung verantwortlichen CYP450-Enzyme.²⁰ Zum Abschluss der Biosynthese von NRPS-abgeleiteten Peptiden wird die Peptidkette mit Hilfe einer C-terminalen Thioesterase (TE) entweder über einen intramolekularen Ringschluss oder eine Hydrolyse an der Thiolgruppe des Ppant-Armes von der Synthetase getrennt.⁸⁰

Eine schematische Darstellung des biosynthetischen Genclusters von Complestatin (**13**), der kodierten NRPS und des postulierten Schrittes der Biaryl- und Biarylether-Bindungsbildung zeigt Abbildung I-6. Die Biosynthese von **13** wird von einem 48.7 kb großen Gencluster kodiert, welches aus 16 Genen besteht.³⁶ In Tabelle I-1 sind alle putativ an der Complestatin-Biosynthese beteiligten Proteine mit ihrer vermuteten Funktion aufgelistet. Die für den Aufbau der linearen Peptidkette verantwortliche NRPS wird von den vier kollinearen Genen *comA*, *comB*, *comC* und *comD* kodiert. Die NRPS selbst schließt außer dem Initialisierungsmodul (M1) sechs weitere Module (M2 bis M7) ein, die das Kettenwachstum fortführten. Die Anzahl der Module entspricht also der Anzahl der Amino- bzw. Ketosäurebausteine, welche die Grundstruktur von **13** bilden. Die fünf in Complestatin (**13**) enthaltenen unnatürlichen, D-konfigurierten Aminosäuren werden durch die fünf E-Domänen in den Modulen 2, 3, 4, 5 und 7 aus der L-Form der Aminosäuren gewonnen. Die M in dem vorletzten Modul 6 ist für die Installation der N-Methyl-Gruppe der vorletzten Aminosäure verantwortlich. Am C-Terminus befindet sich die TE, die nach abgeschlossener Biosynthese das Peptid vom Ppant-Arm der letzten T-Domäne trennt. Bis zum Abschluss der Biosynthese fehlen noch einige Schritte. Es wird angenommen, dass die Gene *comI* und *comJ* CYP450-Oxidasen kodieren, welche zusammen mit dem Ferredoxin ComK als Elektronenlieferant und einer endogenen Ferredoxin-Oxidoreduktase die Biaryl- und Biarylether-Brücken aufbauen. Des Weiteren führt eine Halogenase Chlorierungen an zwei *p*-HPG-Molekülen und einem *p*-Hydroxybenzoylformiat-Molekül durch.³⁶ Es ist wichtig zu erwähnen, dass die hier dargelegte Biosynthese ausschließlich auf bioinformatische Annahme beruht.³⁶ Weder Teile der Complestatin-Synthetase, noch der oxidativen Tailoring-Enzyme, wurden bislang funktionell untersucht.

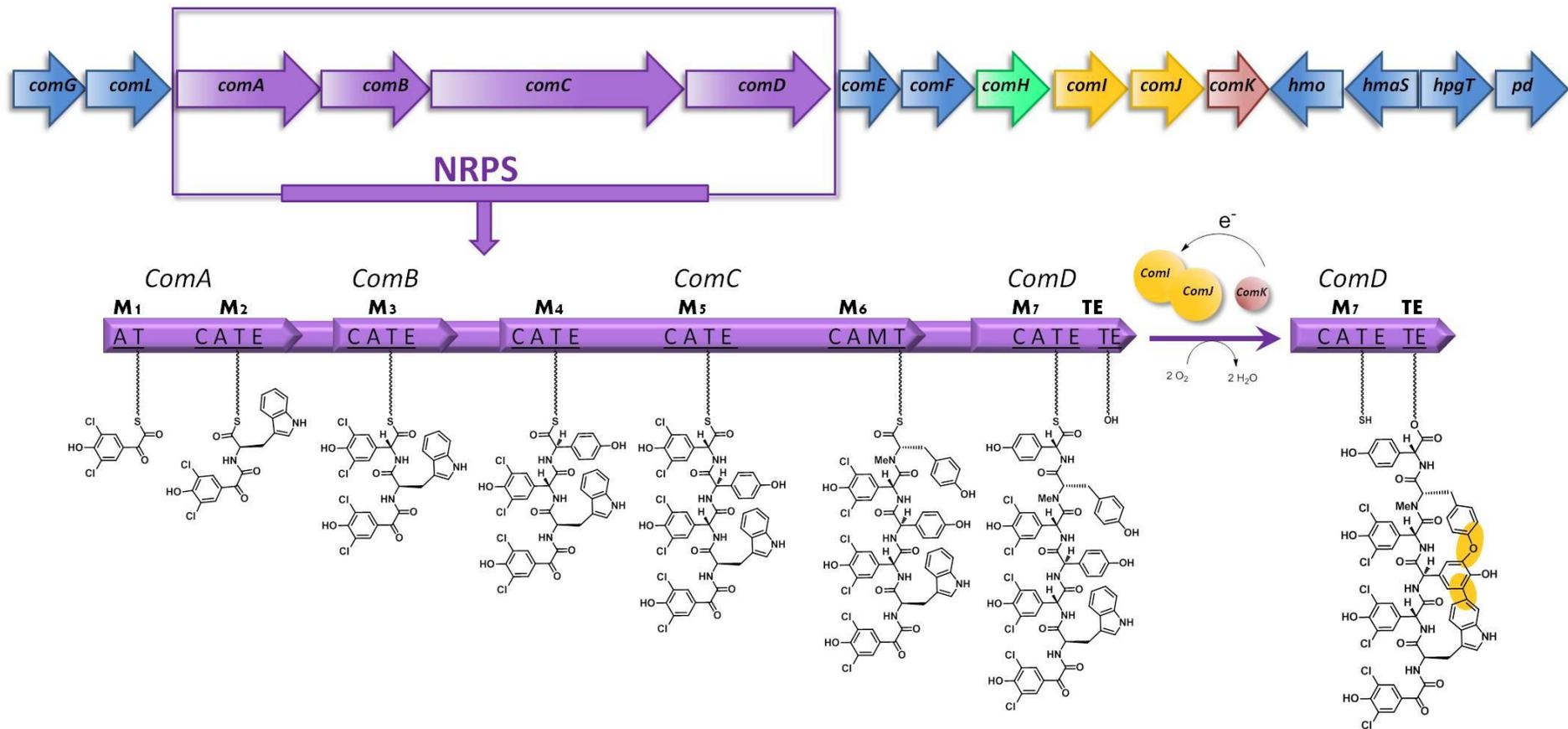


Abbildung I-6. Das Gencluster von Complestatin (**13**), die kodierte NRPS und der vermutete Schritt der Biaryl-Verknüpfung durch ComI und ComJ. A: Adenylierungs-Domäne; T: Thiolierungs-Domäne; C: Kondensations-Domäne; E: Epimerisierungs-Domäne; M: Methylierungs-Domäne; TE: Thioesterase-Domäne.

Tabelle I-1. Durch das Complestatin-Biosynthese-Gencluster kodierte Proteine und deren vorhergesagte Funktionen.³⁶

Protein	Funktion
ComG	Regulator der Transkription
ComL	ABC Transporter
ComA	NRPS
ComB	NRPS
ComC	NRPS
ComD	NRPS
ComE	Hypothetisches Protein
ComF	Integraler Membran-Ionen-Antiporter
ComH	Nicht-Häm-Halogenase
ComI	P450-Oxidase
ComJ	P450-Oxidase
ComK	Ferredoxin
Hmo	<i>p</i> -Hydroxymandelsäure-Oxidase
HmaS	<i>p</i> -Hydroxymandelsäure-Synthase
HpgT	<i>p</i> -Hydroxyphenylglycin-Aminotransferase
PD	Prephenat-Dehydrogenase

Die Komposition des Genclusters zu **13** deutet darauf hin, dass eine einzige Halogenase, ComH, für die Einführung aller Chloratome in **13** zuständig ist.³⁶ Eine Sequenz-Analyse weist daraufhin, dass ComH, kodiert von dem Nicht-Häm-Halogenase-Gen *comH*, homolog zu den metallfreien Halogenasen ist. Allerdings beinhaltet ComH, analog zu Chloroperoxidasen, keine katalytische Triade (Asp-His-Ser). Aufgrund dieser außergewöhnlichen Merkmale wird vermutet, dass die Funktionsweise von ComH einem unbekanntem enzymatischen Mechanismus folgt. Ein Sequenz-Vergleich (*BLAST*) lässt annehmen, dass der Mechanismus von ComH dem von Epoxidasen ähnlich ist. Zurzeit ist noch nicht bekannt, auf welcher Stufe der Complestatin-Biosynthese ComH zum Einsatz kommt. Potenzielle Kandidaten als Substrate für ComH sind freie Amino- bzw. Ketosäuren, die wachsende oder die vollständige lineare, sowie die zyklisierte Peptidkette. In Anbetracht der Biosynthese von **47** und der HpgT-Assay-Ergebnisse von Walsh *et al.* kann angenommen werden, dass **47** selbst oder eine der Biosynthese-Vorstufen das Substrat für ComH ist. Wie in Abbildung I-7 zu sehen ist, wird biosynthetisch L-4-HPG (**47**) aus L-Tyrosin (**43**) gewonnen.^{82,83} Im ersten Schritt desaminiert die *p*-HPG-Aminotransferase HpgT Tyrosin (**43**), wobei 4-Hydroxyphenylpyruvat (**44**) entsteht. Die *p*-Hydroxymandelsäure Synthase HmaS überführt dieses in L-4-Hydroxymandelsäure (**45**). Nach der Oxidation der C2-Hydroxygruppe der Mandelsäure **45** durch die *p*-Hydroxymandelsäure Oxidase Hmo wird in die Ketosäure **46** mittels HpgT eine Aminogruppe eingeführt und L-4-Hydroxyphenylglycin (**47**) wird gebildet.⁸³

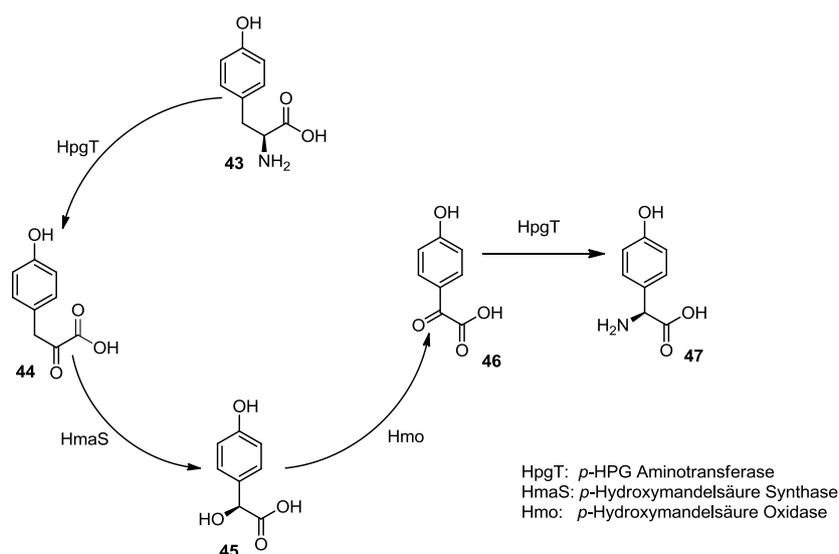


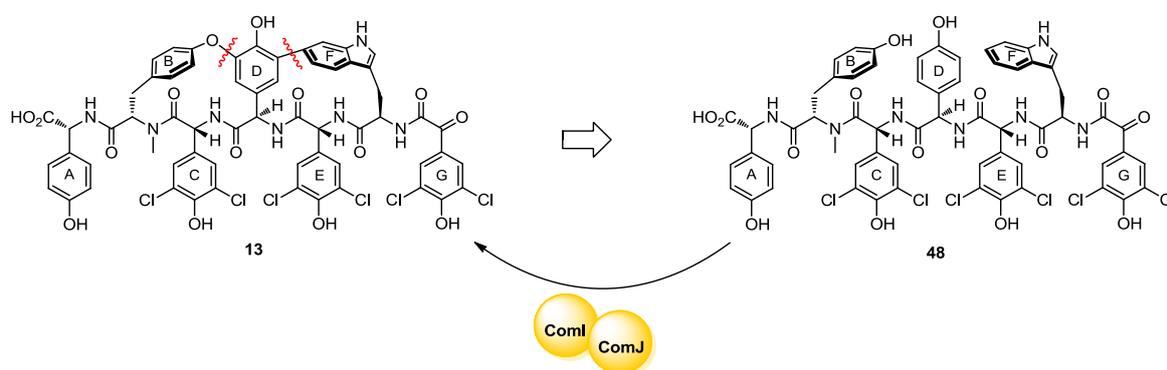
Abbildung I-7. Biosyntheseweg zum L-4-HPG (47) nach Walsh *et al.*⁸³

Für die vollständige Aufklärung der Biosynthese von Complestatin ist es lohnenswert, die Funktionsweise von ComH und den Zeitpunkt der Chlorierung der HPG-Bausteine und der Ketosäure zu ermitteln. Hierzu wären Chlorierungs-Assays mit den Biosynthese-Vorstufen von L-4-HPG (47) als mögliche Substrate für ComH aufschlussreich.

Mit dem Wissen, dass die Natur zwei Aryl-Bindungen über Enzyme spezifisch und ohne Vorfunktionalisierungen in einfache Peptid-Vorläufer einführt, und mit der Möglichkeit, durch biochemische Methoden Proteine heterolog zu exprimieren und zu isolieren, liegt es nahe, die Stärken dieser Biokatalysatoren in chemischen Synthesen zu nutzen. Die Natur nachahmend könnte in einer chemischen Synthesephase die lineare Peptidvorstufe beispielsweise mittels SPPS Baustein für Baustein aufgebaut werden. Vielseitige chemische Synthesemöglichkeiten ermöglichen die Herstellung der einzelnen Bausteine, die nicht kommerziell erhältlich sind. In einer enzymatischen Phase könnten dann die oxidativen Biokatalysatoren eingesetzt werden, die die für Chemiker nur über äußerst komplizierte Synthesewege erreichbaren Biaryl- und Biarylether-Bindungen generieren. Durch die interdisziplinäre Kombination der Stärken von Synthese und Biosynthese könnten strukturell exklusive und medizinisch relevante Naturstoffe auf eine effektive Weise und in größerem Maßstab zugänglich gemacht werden.

II ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die komplizierte Struktur von Complestatin (**13**) stellt eine attraktive Herausforderung für die chemische Synthese dar. Besonders die Stereochemie, explizit die axial-chirale Biarylbindung, erfordert höchst aufwendige Reaktionsabfolgen, wie am Beispiel der von Boger *et al.*^{69,70} bzw. Zhu *et al.*⁷¹ entwickelten Totalsynthesen gezeigt (Kapitel I.3.). In diesen Totalsynthesen dienen die meisten Syntheseschritte zur Generierung der korrekten Konfiguration der Biarylbrücke sowie zur Schützung und Entschützung der Seitenketten. Ferner addieren sich Reaktionsschritte durch Funktionalisierungen der Bausteine für die Durchführung der Kupplungen, da diese keine einfachen, käuflichen Aminosäuren sein können. Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, eine effizientere Synthesestrategie zu etablieren, die auf einfachstem und kürzestem Weg zu linearen Vorstufen von **13** führt. Nachdem die Biosynthese des nicht-ribosomalen Naturstoffes **13**, in der durch die CYP450-Enzyme ComI und ComJ in einem einzigen Schritt die Biaryl- und Biarylether-Bindungen aufgebaut werden, bioinformatisch postuliert wurde,³⁶ sollte für die Totalsynthese von Complestatin (**13**) die Stärken der Chemie und die Leistungsfähigkeit der Enzyme kombiniert werden. Bevor die Studien zur chemo-enzymatischen Totalsynthese von **13** im Rahmen dieser Dissertation begannen, war nur eine einzige erfolgreiche, biokatalytische Knüpfung für eine der drei Biaryl-Strukturelemente des Vancomycins (**10**) bekannt.⁸⁴ In dieser Arbeit sollte nun in einer zweiphasigen Synthesestrategie zunächst, wie auch in der Biosynthese, die lineare Peptidkette **48** mittels Peptidkupplungschemie hergestellt werden. Durch die Anwendung der oxidativen Biaryl-Kupplungsenzyme aus dem Complestatin-Gencluster sollten die Ringschlüsse biokatalytisch erfolgen (Schema II-1).



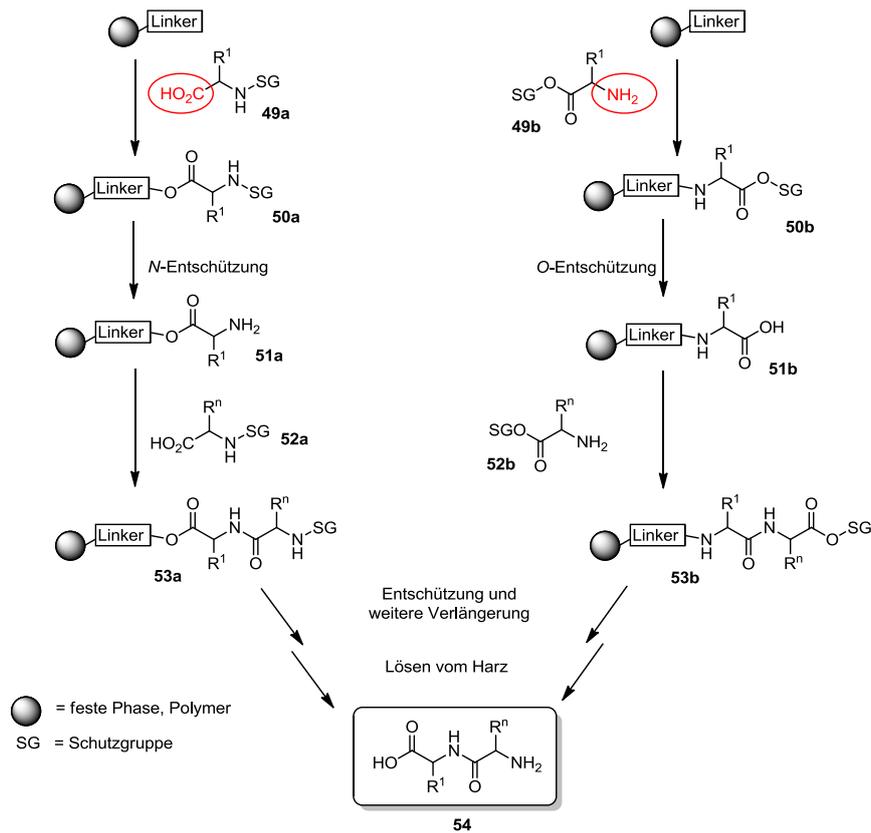
Schema II-1. Retrosynthetische Darstellung der Complestatin-Synthese aus der linearen Peptidkette **48**.

Um die chemo-enzymatische Totalsynthese möglichst einfach zu gestalten, sollte in der chemischen Peptidsynthese auf Schutzgruppen an den Seitenketten verzichtet werden. Die zu etablierende Methode sollte nicht nur der schnellen und einfachen Synthese eines komplexen, makrozyklischen

Moleküls dienen, sondern auch einen Zugang zu strukturellen Modifikationen des Naturstoffs und somit zu neuen, eventuell medizinisch relevanten Wirkstoffen mit verbesserten biologischen Eigenschaften bieten.

II.1. Festphasenpeptidsynthese

Merrifield führte 1963 eine Methode zur Peptidsynthese ein, die zugleich eine Automation ermöglichte.^{85,86} Obwohl durch neue Kupplungsreagenzien und Kupplungsmethoden die Synthese von kleinen Peptiden in der Flüssigphase leicht zugänglich ist, treten bei der Synthese von längeren Peptidketten Probleme bzgl. Löslichkeit und Isolierung auf. Die von Merrifield entwickelte SPPS erlaubt die Durchführung von Peptidkupplungen an einer festen Phase, wodurch lösliche Reagenzien und Nebenprodukte durch einfache Filtration und mehrmaliges Waschen aus dem Reaktionsansatz entfernt werden können. Somit ist eine simple und schnelle Versuchsdurchführung und Aufreinigung gewährleistet. Dabei wird die erste geschützte Aminosäure **49** an ein festes Polymer kovalent gebunden und schrittweise werden weitere Aminosäuren **52** bis zur gewünschten Sequenz gekuppelt (Schema II-2). Jede Peptidkupplung erfolgt nach der Entfernung der Schutzgruppe der zuvor eingebauten Aminosäure in **50** an der dann freien funktionellen Gruppe in **51**. Ist die gewünschte Peptidkettenlänge (**53**) erreicht, wird das Produkt **54** vom Harz gelöst. Diese Strategie lässt die für die flüssige Phase üblichen Reinigungsmethoden wie Extraktion, Säulenchromatographie oder Umkristallisation, welche mit viel Arbeits- und Zeitaufwand sowie Ausbeuteverlust verbunden sind, entfallen. Dadurch wird ein Vorteil bzgl. Geschwindigkeit und Einfachheit des Vorgangs gegenüber der Synthese in der flüssigen Phase gewährleistet.⁸⁵ Erwähnenswert ist hier, dass für Synthesen im großen Maßstab die Flüssigphasenpeptidsynthese die geeignetere Methode ist,⁸⁶ weil das Beladungsvermögen der festen Phasen begrenzt ist. Ein geeignetes Harz für die feste Phase ist ein Polymer, das sich nicht in den für die Peptidsynthese gängigen Lösungsmitteln löst, das eine stabile physikalische Form besitzt und damit filtrierbar ist und außerdem eine funktionelle Gruppe beinhaltet, den sogenannten Linker zwischen Polymer und der ersten Aminosäure. Polymere wie Cellulose, Polyvinylalkohol, Polymethylacrylat, Divinylbenzol- oder Polystyrolerivate erfüllen diese Bedingungen am besten.⁸⁵ Die Harz-Kügelchen mit einer Porengröße von 200 bis 400 mesh (74 bis 37 µm) besitzen eine durchlässige Gelstruktur, die das Eindringen von Reagenzien insbesondere in schwelenden Lösungsmitteln wie Dichlormethan (DCM) oder Dimethylformamid (DMF) zulässt und damit eine bessere Wechselwirkung zwischen Reagenzien und Peptidkette ermöglicht. Dadurch können trotz sterischer Hinderung Reaktionen mit vollständigem Umsatz ablaufen.^{85,86}

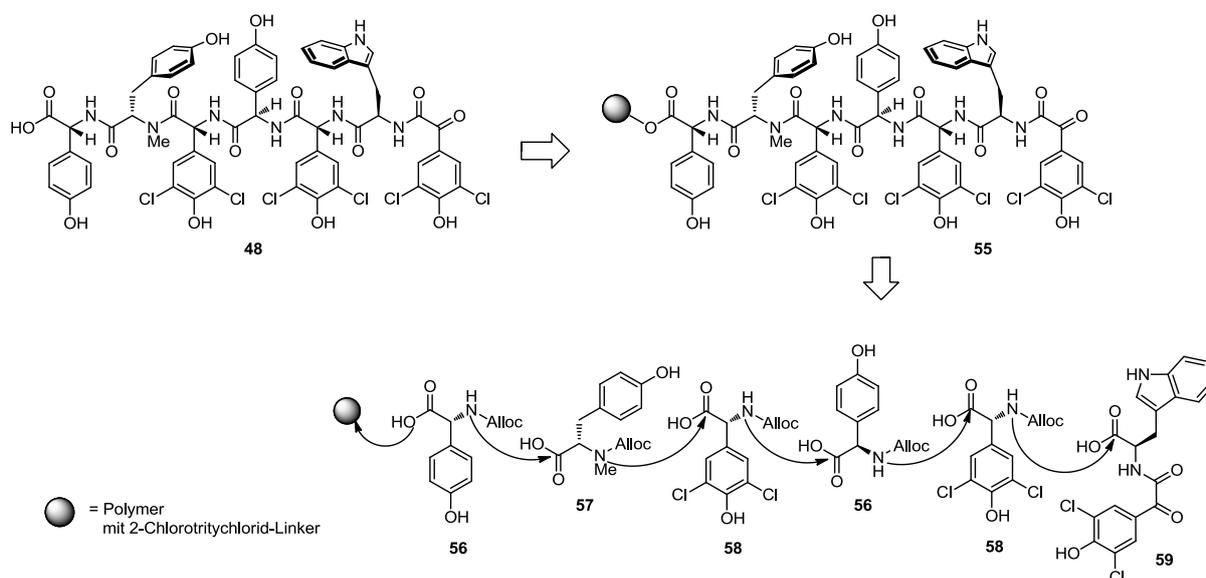


Schema II-2. Darstellung des SPPS-Prinzips.

Die sterische Hinderung kann sogar vorteilhaft sein: z. B. wirken feste Phasen mit einem Trityl-Linker, entwickelt von Barlos *et al.*,⁸⁷ durch den großen Strukturbauelement des Trityls einer unerwünschten Diketopiperazinbildung entgegen.⁸⁶ Trityl-Harze sind zudem äußerst säurelabil, wodurch eine milde, saure Behandlung ausreicht, um die fertige Peptidkette vom Harz zu trennen. Somit wird einer möglichen Racemisierung bei der Hydrolyse vorgebeugt.^{86,88} Überdies zeigt der Trityl-Rest eine hohe Stabilität gegenüber nukleophilen Angriffen auf, was für Peptidkupplungschemie aufgrund einiger eingesetzter Basen von großer Bedeutung ist. Diese Eigenschaften, z. B. der 2-Chlortritylchlorid-Harze, und die Möglichkeit, bifunktionale Bausteine wie Aminosäuren mit ungeschützten Seitenketten, z. B. HPG, zu binden, machen Trityl-Linker für den Einsatz in SPPS-Reaktionen mit Aminosäuren, die zur Racemisierung neigen, sehr attraktiv.⁸⁸ Diese Attraktivität wird dadurch erhöht, dass das Harz mit dem Trityl-Linker auf einfache Weise regenerierbar ist.^{87,88}

II.1.1. SPPS zur linearen Complestatin-Vorstufe

Complestatin (**13**) besteht aus einem Bicyklus mit einer Biaryl- und Biaryletherbindung und beinhaltet sieben aromatische, zum Teil Chlor-haltige Bausteine. Die lineare Vorstufe **48** stellt ein Heptapeptid dar, wobei eine Aminosäure durch eine Ketosäure ersetzt ist. Die D-4-HPG-Bausteine, die den Hauptanteil der komplizierten Complestatin-Struktur darstellen, sind aufgrund des elektronenziehenden, aromatischen Systems an der α -Position wegen der leichten Abspaltung des aciden Protons besonders anfällig für eine Racemisierung.⁸⁹ Aus diesem Grund erschien die SPPS mit ihren milden Methoden eine ausgezeichnete Wahl für die Herstellung von **48** (Schema II-3).

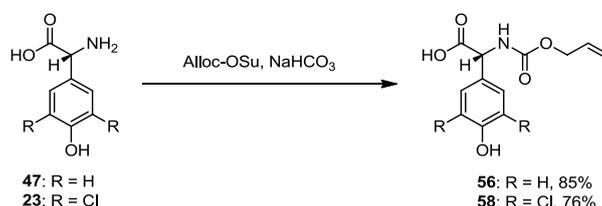


Schema II-3. Retrosynthetische Darstellung der linearen Complestatin-Vorstufe **48** mittels SPPS.

Durch die Anwendung der Allyloxycarbonyl-Schutzgruppenmethode (Alloc) (**56 - 58**) sollte in dieser Arbeit die Verwendung einer starken Base oder Säure, die bei der Entschützung der für gewöhnlich eingesetzten 9-Flourenylmethoxycarbonyl (Fmoc)- bzw. *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Aminoschutzung notwendig sind, vermieden werden. Die Pd-katalysierte Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe hat nämlich keine Auswirkung auf das Epimerisierungs-empfindliche $C\alpha$ -Atom der HPG-Bausteine. Das 2-Chlortritylchlorid-Harz in **55** bot sich ferner aus den oben genannten Gründen als optimale Festphasenkomponente an. Ein Beispiel für die Durchführung einer SPPS zur Synthese einer aromatenreichen Peptidkette lieferten 2005 Robinson *et al.*⁹⁰ An 2-Chlortritylchlorid-Harz synthetisierten sie unter Anwendung von *N*-Alloc-Schützung vereinfachte, lineare Hexa- bzw. Heptapeptid-Intermediate der Vancomycin-Biosynthese.

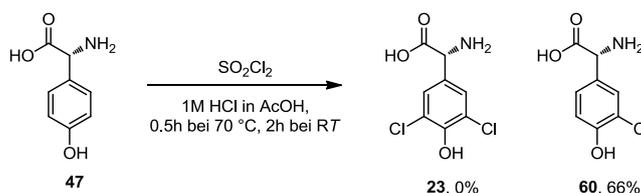
II.1.1.1. Synthese der Complestatin-Bausteine für die SPPS von 48

Keine der für die SPPS von **48** benötigten Amino- bzw. Ketosäuren ist kommerziell erhältlich. Für die Herstellung von *N*-Alloc-D-4-HPG (**56**) war eine *N*-terminale Schützung von D-4-HPG (**47**) durchzuführen. Hierfür wurde **47** unter dem Einfluss von Natriumhydrogencarbonat mit *N*-Alloc-Succinimidester (Alloc-OSu) versetzt und mit 85 % iger Ausbeute in die geschützte Form **56** umgewandelt (Schema II-4).⁴⁴ Auf die gleiche Weise wurde **58** aus 3,5-Dichlor-D-4-HPG (**23**) mit einer Ausbeute von 76 % hergestellt. Da die Chloratome am Aromaten durch einen negativen induktiven Effekt (-I-Effekt) die Acidität von **23** steigern, wurden für die Alloc-Schützung hierbei nur 0.9 Äquivalente (eq) Natriumhydrogencarbonat, statt einem Überschuss von 1.45 eq eingesetzt, um eine mögliche Racemisierung zu vermeiden.



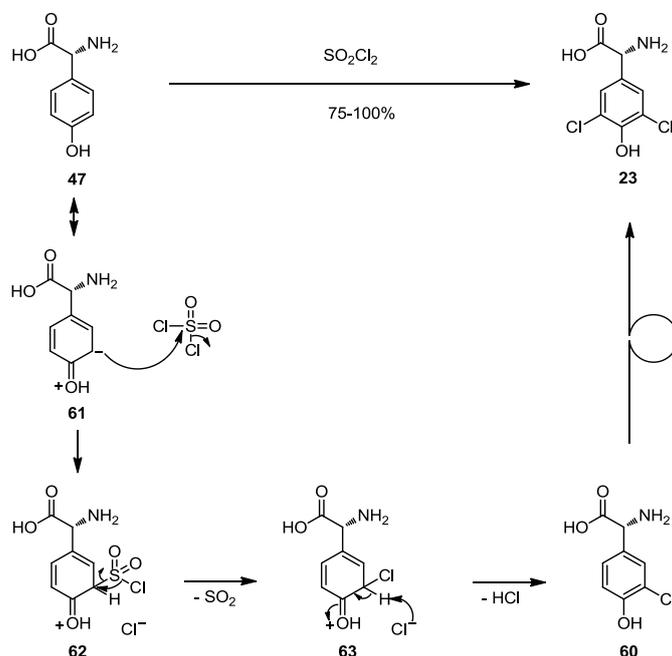
Schema II-4. Reaktionsschema zur *N*-Alloc-Schützung von D-4-HPG (**47**) und 3,5-Dichlor-D-4-HPG (**23**).

Für die Bischlorierung von **47** wurde zunächst eine Literatur-bekannte Versuchsdurchführung angewendet.⁶⁴ Der Reaktionsvorschrift von Yamada *et al.* folgend wurde **47** in einer Lösung aus 1 M HCl in Essigsäure gelöst und tropfenweise mit Sulfurylchlorid in Essigsäure versetzt. Anschließend wurde für 30 min bei 70 °C und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das gewünschte bischlorierte HPG sollte schließlich mit Diethylether gefällt und umkristallisiert werden. Diese Bedingungen lieferten jedoch nicht **23**. Das ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts (keine Umkristallisation aus HCl und NH₃) zeigte eindeutig, dass statt **23** ausschließlich und in reiner Form die monochlorierte Version **60** in 66 % Ausbeute synthetisiert worden war (Schema II-5), was zu dem Zeitpunkt eine unveröffentlichte Verbindung darstellte. Inzwischen konnten Becker *et al.* unabhängig von dieser Arbeit **60** unter ähnlichen Bedingungen synthetisieren.⁹¹ Demnach kann 3-Chlor-4-HPG (**60**) auch durch Zugabe von Sulfurylchlorid zu einer Suspension aus **47** in Essigsäure unter Rühren bei Raumtemperatur für 16 h hergestellt werden.



Schema II-5. Synthese von 3-Chlor-4-HPG (**60**) unter Reaktionsbedingungen, die eigentlich **23** liefern sollten.

Letztendlich erfolgte die Bischlorierung von **47** mit Sulfurylchlorid, wobei die Reaktion in Sulfolan und unter Argon-Atmosphäre durchgeführt wurde.⁹² Diese interessante S_Ni -artige Reaktion (innere nukleophile Substitution) erforderte die Aufteilung der Zugabe des Chlorierungsreagenzes in zwei Portionen. Denn bei direkter Zuführung von 4.5 eq Sulfurylchlorid entstand hauptsächlich monochloriertes HPG **60** mit geringfügigem Anteil an dem gewünschten bischlorierten HPG (**23**). Durch die Reduktion der Sulfurylchlorid-Stöchiometrie auf 4.0 eq und dessen Zugabe in zwei Portionen wurde ausschließlich **23** gebildet. Dabei war darauf zu achten, dass jede Sulfurylchlorid-Portion tropfenweise über einen Zeitraum von mindestens 10 min hinzugefügt wurde und nach der ersten Zugabe den Reagenzien eine Reaktionszeit von 2 h gestattet wurde. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Bischlorierung um eine zweifache S_Ni -Reaktion handelt. Dabei greift zunächst das aromatische System in *ortho*-Position zur Hydroxyfunktion über die mesomere Grenzstruktur **61** das partial positiv geladene Schwefelatom nukleophil an, so dass das Sulfonsäurechlorid **62** entsteht (Schema II-6). Anschließend findet der intramolekulare, nukleophile Angriff durch das Chlorid des Sulfonsäurechlorid-Rests statt, wodurch Schwefeldioxid freigesetzt wird. Durch Deprotonierung von **63** wird unter HCl-Bildung das aromatische System wiederaufgebaut und das 3-Chlor-D-4-HPG (**60**) erhalten. Die erneute Zugabe von Sulfurylchlorid führt zur Wiederholung dieses Vorgangs an Position-5 von **60**, womit das bischlorierte HPG **23** gebildet wird.

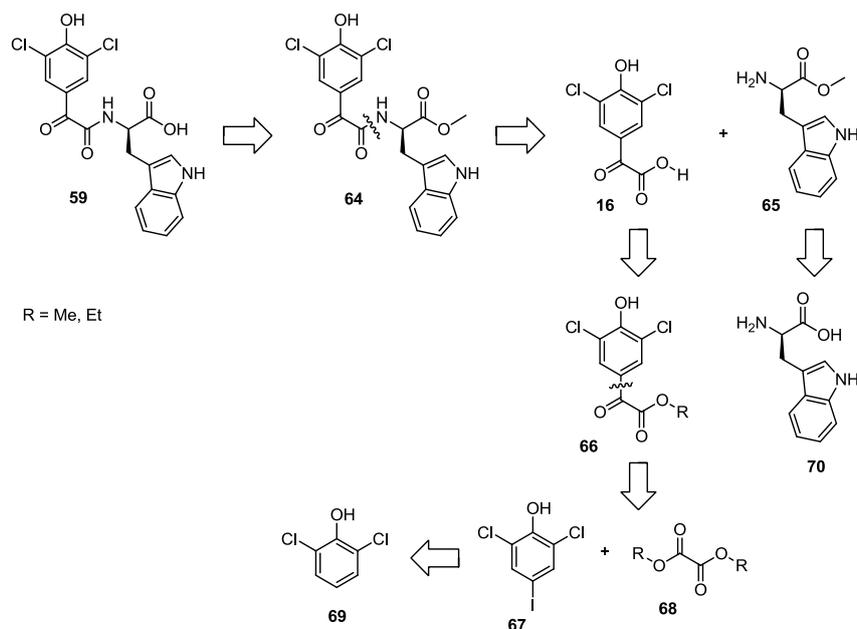


Schema II-6. Mechanismus der Bischlorierungsreaktion.

Nach Reaktionsende wurde das Hydrochlorid-Salz von **23** mittels trockenem Dichlormethan bzw. Diethylether ausgefällt. Die Ausbeute variierte dabei zwischen exzellenten 100 % und guten 75 %.

Eine mögliche Ursache für diese Schwankung liegt wahrscheinlich in den verwendeten Lösungsmitteln, die sich in ihrem Restwassergehalt unterschieden. Da das Produkt **23** wasserlöslich ist, kann eine quantitative Ausfällung des Produktes durch eventuell vorhandenes Restwasser in den Lösungsmitteln verhindert werden.

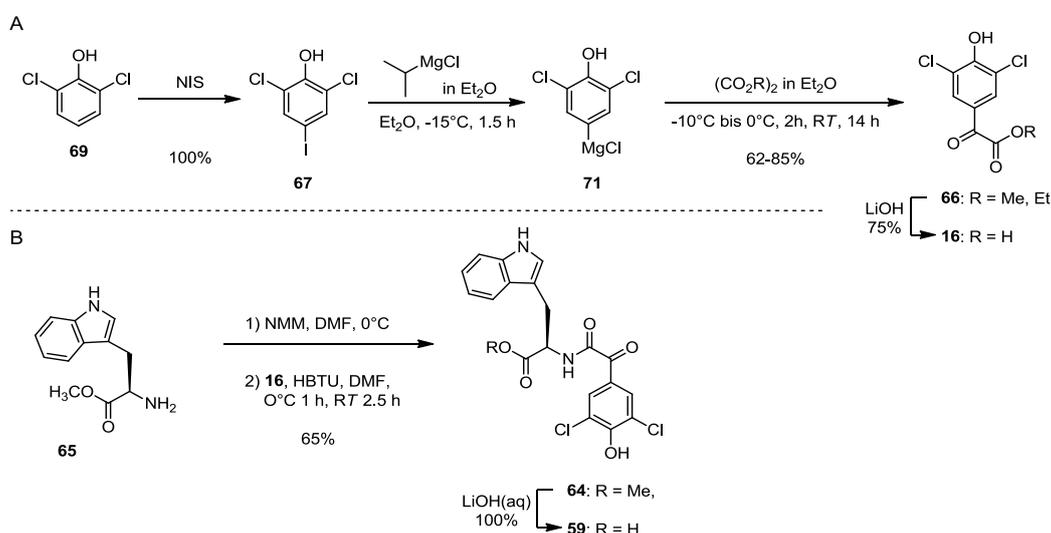
Der letzte Baustein (**59**) der linearen Complestatin-Vorstufe (**48**) ist ein Dipeptid bestehend aus D-Tryptophan (**70**) und 2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoessigsäure (**16**). Eine retrosynthetische Betrachtung von **59** ergab die erste Spaltung an der Peptidbindung in **64**, was zu den Einzelkomponenten **16** und **65** führte. Während der Methylester **65** in einem einzigen Schützungs Schritt aus D-Trp (**70**) darzustellen war, lieferte die Retrosynthese von **16** eine Sequenz aus drei Reaktionen. Dabei wurde der Ketoester **66** in zwei Fragmente, **67** und **68**, unterteilt. **68** ist kommerziell erhältlich und **67** erfordert die Darstellung aus 2,6-Dichlorphenol (**69**). Dies lieferte eine Syntheseroute zu **59** über den Methylester **64**, die aus fünf linearen Stufen besteht (Schema II-7).



Schema II-7. Darstellung zur Retrosynthese des Complestatin-Bausteins **59**.

Den Anfang der Synthese von **59** bildete die quantitative Iodierung von 2,6-Dichlorphenol (**69**) mittels *N*-Iodsuccinimid (NIS).⁶⁸ Das 3,5-Dichlor-4-iodophenol (**67**) wurde über zwei Schritte zum 2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoessigsäureester (**66**) in einer Ausbeute von 85 % umgesetzt. Hierbei wurde **67** über eine Grignard-Reaktion durch Umpolung des mit Iod substituierten Kohlenstoffs für einen nukleophilen Angriff an Ethyl- bzw. Methyloxalat (**68**) aktiviert (Schema II-8). Alternativ wurde auch eine Umpolung durch Lithiierung getestet. Es stellte sich heraus, dass die Herstellung des Ketoesters **66** über das Magnesiumchlorid-Intermediat **71** besser durchführbar ist, als durch eine Lithiierungsreaktion mittels *n*-Butyllithium. Außer der Ausbeutedifferenz von 20 % zugunsten der

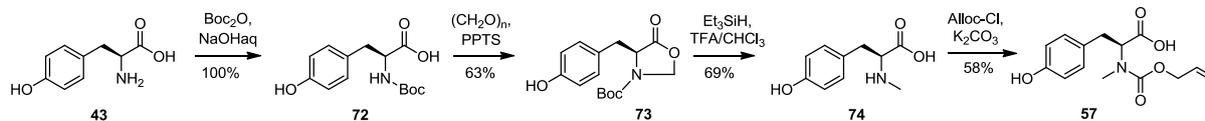
Grignard-Reaktion war die praktikablere Reaktionstemperatur von $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei der Umpolung durch Isopropylmagnesiumchlorid anstatt von $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei der Lithiierung vorteilhaft. Zunächst wurde als Elektrophil der flüssige Oxalsäurediethylester als zu addierende Ketoestergruppe eingesetzt, welcher stets frisch destilliert wurde. Da der Oxalsäuredimethylester im festen Aggregatzustand vorliegt und daher ein zusätzlicher Reinigungsschritt wie beim Ethyloxalat ausgelassen werden konnte, wurde **66** auch als Methylester hergestellt. Während der Oxalsäureester mit der Ethylestergruppe eine Ausbeute von 85 % lieferte, erbrachte das Methyloxalat lediglich eine Ausbeute von 62 %. Eine milde Verseifung mittels einer wässrigen 0.1 N Lithiumhydroxid-Lösung lieferte den zweiten Baustein **16** des Dipeptid-Methylesters **64** mit 75 % iger Ausbeute. Die Schützung der Säuregruppe von D-Tryptophan (**70**) in Form des entsprechenden Methylesters **65** gelang mit einer sehr guten Ausbeute von 96 %. Die Darstellung des Indol-Derivats **59** ermöglichte eine Peptidkupplung zwischen D-Trp-OMe (**65**) und der Ketosäure **16** zum Indol-Derivat **64** mit Hilfe des Kupplungsreagenzes 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und *N*-Methylmorpholin (NMM) als organische Base in einer Ausbeute von 65 %. Die abschließende Behandlung des Methylesters **64** mit Lithiumhydroxid lieferte den letzten Baustein **59** der linearen Peptidkette **48** in quantitativer Ausbeute. Schließlich erbrachte der sechs-stufige Syntheseweg das gewünschte Dipeptid **59** in einer Gesamtausbeute von 40 %.



Schema II-8. A) Synthese der 2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoessigsäure (**16**). B) Synthese des Indol-Derivats **59**.

Der zweite Baustein der linearen Peptidkette **48** des Complestatins (**13**) ist *N*-Alloc-*N*-methyl-L-tyrosin (**57**). Die Darstellung von **57** erwies sich als eine große Herausforderung. Verschiedene Versuche mussten unternommen werden, um zum Zielmolekül **57** zu gelangen. Der erste Versuch

bestand darin, zunächst *N*-Methyl-L-tyrosin (**74**) über das Oxazolidinon **73** zu synthetisieren (Schema II-9).



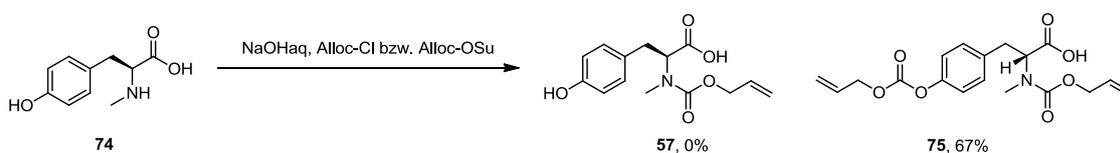
Schema II-9. Syntheseroute zur Darstellung des Bausteins **57** der linearen Complestatin-Vorstufe **48**.

Hierzu wurde nach der *N*-Schützung von **43** das *N*-Boc-Tyr (**72**) mit Paraformaldehyd und Pyridinium-*p*-toluolsulfonat versetzt und zum Rückfluss erhitzt, wobei das entstehende Wasser über einen Wasserabscheider entfernt wurde.⁹³ Das so gebildete Tyrosinoxazolidinon **73** wurde mittels Triethylsilan und Trifluoressigsäure (TFA) wieder gespalten, um **74** über drei Schritte in einer Gesamtausbeute von 43 % zu erhalten. Während diese Syntheseschritte in guten bis akzeptablen Ausbeuten verliefen, bereitete der letzte Schritt, die Alloc-Schützung von **74**, Probleme. Die erste Idee, die Schützungsbedingungen aus der HPG-Schützung (Alloc-OSuc, NaHCO₃; s. Seite 21) auch hier anzuwenden, scheiterte. Es konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden. Ein zweiter Ansatz war, den Alloc-Succinimidester gegen Alloc-Chlorid auszutauschen. Jedoch konnte auch auf diesem Weg kein *N*-Alloc-*N*-methyltyrosin (**57**) erhalten werden. Die Zweitsubstitution durch die Methylgruppe am Stickstoff in **74** schien die Alloc-Schützung durch sterische Hinderung stark zu erschweren. Außerdem wurde vermutet, dass ein zweites Problem in der extrem schlechten Löslichkeit des *N*-Methyltyrosins (**74**) in den gängigen organischen Lösungsmitteln oder in Wasser lag. Im Folgenden sollte zunächst getestet werden, ob durch eine Umkehr der Reaktionsabfolge, also zuerst *N*-Alloc-Schützung gefolgt von *N*-Methylierung, die Darstellung von **57** möglich wäre. Die Einführung der Alloc-Schutzgruppe in **43** gelang in 64 % Ausbeute. In der anschließenden Methylierung wurde Natriumhydrid als Base und Iodmethan als Methylierungsmittel verwendet. Leider führte auch dieser Versuch nicht zu **57**. In weiteren Versuchen sollte nun getestet werden, ob die beschriebene Reaktionssequenz mit Tyrosinmethylester als Substrat durchführbar wäre. Die Veresterung der Säuregruppe sollte die Löslichkeit des Substrats erhöhen und gleichzeitig mögliche Nebenreaktionen mit der vormals freien Säurefunktionalität verhindern. So wurde zunächst die Säuregruppe von **43** verestert, dem folgend die Aminogruppe mit Alloc-Chlorid als auch Alloc-OSu geschützt und anschließend der *N*-Methylierungsversuch durchgeführt. Tatsächlich war es so möglich, die Aminogruppe sowohl Alloc-geschützt als auch *N*-methyliert in einer Ausbeute von 30 % über drei Schritte zu erhalten. Überraschenderweise ließ sich jedoch die Säureschutzgruppe weder mit 0.1 LiOH(aq) noch mit 1 N NaOH(aq) entfernen. Um andere Verseifungsmethoden zu testen, sollte mehr *N*-Alloc-*N*-methyl-L-tyrosinmethylester hergestellt werden. Unglücklicherweise konnte

die *N*-Methylierung von *N*-Alloc-Tyrosinmethylester trotz mehrerer Versuche nicht reproduziert werden.

Parallel zu den oben beschriebenen alternativen Syntheserouten zu **57** wurden Experimente zur Verbesserung der Löslichkeit von *N*-Methyl-L-tyrosin (**74**) durchgeführt. Khalil *et al.* berichten, dass die lipophile Base Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) durch die Bildung des entsprechenden Tetramethylammoniumsalzes einer *N*-alkylierten Aminosäure das Lösen dieser Aminosäure in trockenem Acetonitril ermöglicht.⁹⁴ Diese Methode sollte nun auch bei der *N*-Schützung des *N*-Methyltyrosins (**74**) angewendet werden. Für die Übertragung der Alloc-Gruppe wurde Alloc-Chlorid eingesetzt. Es konnten Hinweise auf die Bildung des gewünschten Produkts **57** im ¹H-NMR-Spektrum (Roh-NMR) beobachtet werden. Eine HPLC-Analyse zeigte jedoch drei weitere Signale, von denen eines dem Edukt zugeordnet wurde. Die Reaktion wurde erneut durchgeführt, wobei der Reaktionsverlauf mittels HPLC beobachtet wurde. Das Ergebnis dieser Untersuchung ergab, dass alle drei Produkte gleichzeitig entstanden und daher diese Reaktionsbedingungen für die *N*-Alloc-Schützung für *N*-Methyltyrosin (**74**) nicht gut geeignet sind.

Die erfolglosen Versuche führten zurück zu den Ausgangsbedingungen der Alloc-Schützung. Für die Optimierung wurde anstelle des festen NaHCO₃ eine 1 N wässrige NaOH-Lösung als Base eingesetzt. In der wässrigen NaOH-Lösung löste sich Methyltyrosin (**74**) schließlich problemlos (Schema II-10). Als Alloc-Überträger wurden Alloc-Succinimidester sowie Alloc-Chlorid getestet. Alloc-Chlorid erschien hier geeigneter, da bei der Umsetzung von **74** im Gegensatz zum Alloc-Succinimidester kein Produktgemisch entstand. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Reaktion mit Alloc-Chlorid zur Bildung des zweifach geschützten Tyrosins **75**, anstatt des gewünschten Produkts **57** führte.



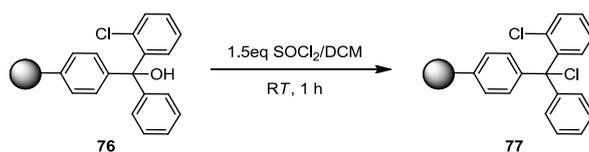
Schema II-10. Alloc-Schützung des Methyltyrosins (**74**) mit Natriumhydroxid als Base.

Das in dieser Reaktion eingesetzte *N*-Methyltyrosin (**74**) enthielt noch Reste von Triethylsilan aus der Reaktion **73** → **74** (vgl. Schema II-9), das aufgrund der Löslichkeitsprobleme mit **74** nicht vollständig entfernt werden konnte. Es wurde jedoch ursprünglich davon ausgegangen, dass die Schützung der Aminogruppe von Triethylsilan nicht behindert werden sollte. Da die Ansätze bzgl. des eingewogenen Rohprodukts **74** berechnet wurden, befand sich jedoch Alloc-Chlorid im dreifachen Überschuss, anstatt in stöchiometrischen Mengen, in der Reaktionslösung. Daher wurde angenommen, dass die Dischützung dem überschüssigen Alloc-Chlorid zu verschulden war. Die Reaktion wurde folglich mit

reduzierter Alloc-Chlorid-Menge wiederholt, wobei zu beachten ist, dass die Alloc-Chlorid-Zugabe in fünf Portionen über 5 h erfolgte. Dies führte letztendlich zur Bildung des gewünschten Produkts **57** jedoch als ein Gemisch mit dem zweifach geschützten Derivat **75**. Obwohl das gewünschte Produkt **57** dabei im Überschuss entstand, lag die Ausbeute bei lediglich 16 %. Nach diesem Ergebnis wurde anstelle von Natriumhydroxid Dikaliumcarbonat als eine schwächere Base eingesetzt, um somit die Deprotonierung des phenolischen Protons zu verhindern. Desweiteren musste die eingesetzte Base stark genug sein, um *N*-Me-Tyr (**74**) in Lösung bringen zu können. In diesen Reaktionen bildete sich zuerst eine Suspension, die sich nach der ersten Alloc-Chlorid-Zugabe löste. Auf diese Weise wurde **57** zwar in höherer Ausbeute von 58 % erhalten, die Bildung des zweifach geschützten Nebenprodukts konnte jedoch nicht vollständig verhindert werden (10 %). In der Zwischenzeit war die Alloc-Schätzung des *N*-Me-HPG (**109**, vgl. Kapitel II.1.2.1) mit gereinigtem Ausgangsstoff, Alloc-OSu als Alloc-Überträger und Natriumhydrogencarbonat als Base in guten Ausbeuten gelungen. Daher wurde angenommen, dass das restliche Triethylsilan die Reaktion zwischen *N*-Methyltyrosin (**74**) und dem Alloc-Überträger im Gegensatz zu früheren Vermutung doch behinderte. Zur Reinigung von **74** sollten sich nun die bisher sehr hinderlichen schlechten Lösungseigenschaften dieser Verbindung zu Nutze gemacht werden. Tatsächlich konnte durch einfaches Waschen des aus der Reaktion erhaltenen Feststoffs mit Aceton sauberes Produkt erhalten werden. Allerdings senkte dies die Reaktionsausbeute der Oxazolidinonspaltung von 84 % (berechnet aus dem ¹H-NMR-Spektrum) auf 69 %. Die Alloc-Schätzung des reinen **74** wurde nun unter den selben Bedingungen wie die Schätzung des *N*-Me-HPG (**109**) durchgeführt. Die Reaktion lieferte das gewünschte *N*-Alloc-*N*-methyltyrosin (**57**) ohne die Bildung des digeschützten Nebenprodukts **75** in einer Ausbeute von 48 %. Die Gesamtausbeute der vierstufigen Syntheseroute ausgehend von **43** (Schema II-9) betrug 25 %.

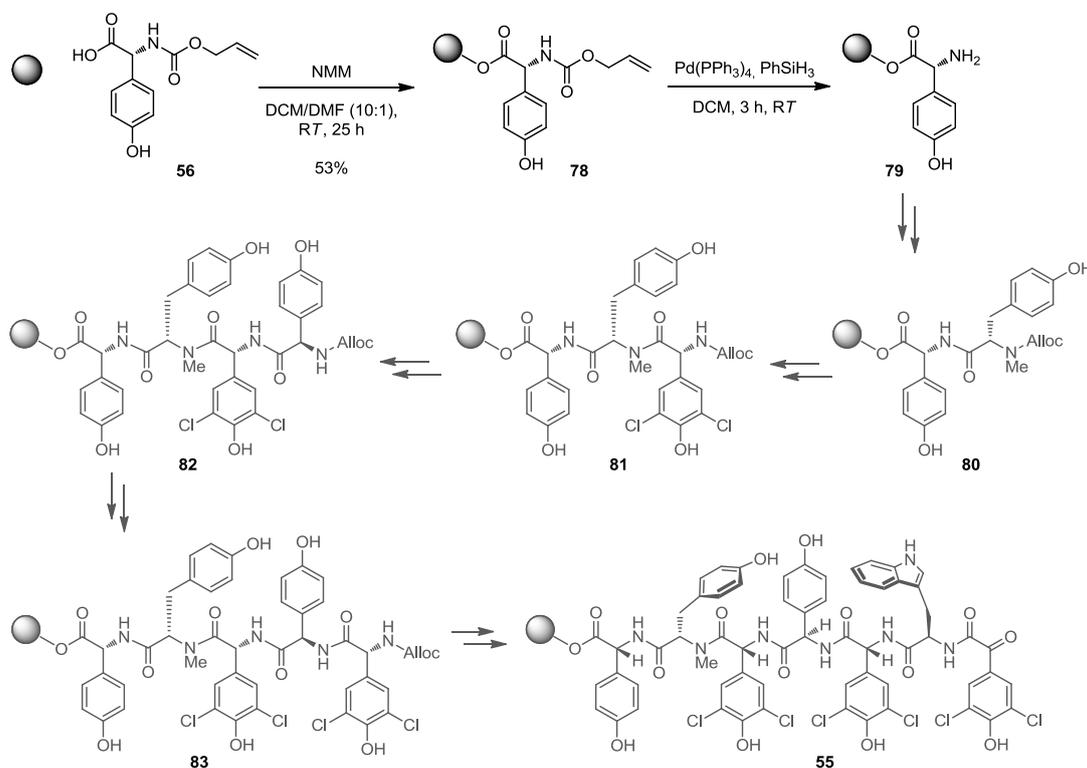
II.1.1.2. SPPS-Experimente zur Herstellung der linearen Complestatin-Vorstufe 48

Neben den Syntheseversuchen der Bausteine wurden parallel die Experimente an der festen Phase begonnen. Der 2-Chlortritylchlorid-Linker des zu verwendenden Harzes ist sehr empfindlich gegenüber Feuchtigkeit. Dies bedeutet, dass das Chlorid der reaktiven Form **77** durch Wasser aus der Luftfeuchtigkeit zu **76** substituiert wird. Dieses Chlorid wird durch das Aktivieren von **76** mittels Thionylchlorid in Dichlormethan vor dem Laden der ersten Aminosäure wieder resubstituiert (Schema II-11). Auf diese Weise kann das Harz re-aktiviert werden.



Schema II-11. Prinzip der Harzaktivierung.

Nachdem das Harz aktiviert wurde, wurde die erste Aminosäure **56** der linearen Complestatin-Peptidkette **48** mit Hilfe der organischen Base NMM in einer Ausbeute von 53 % an das Harz gebunden. Um zu vermeiden, dass in den folgenden Kupplungsreaktionen eine Bindung zwischen noch reaktiven Trityl-Resten und den zu kuppelnden Aminosäuren entsteht, wurde **78** mit einer Mischung aus DCM, MeOH, DIPEA (Diisopropylethylamin) (80 : 15 : 5) versetzt, sodass die freien Chlor-Trityl-Gruppen durch -OMe inaktiviert wurden. Anschließend wurde die Alloc-Gruppe von **78** über eine Pd-katalysierte Reaktion entfernt, um an Harz-gebundenes D-4-HPG (**79**) zu erhalten.

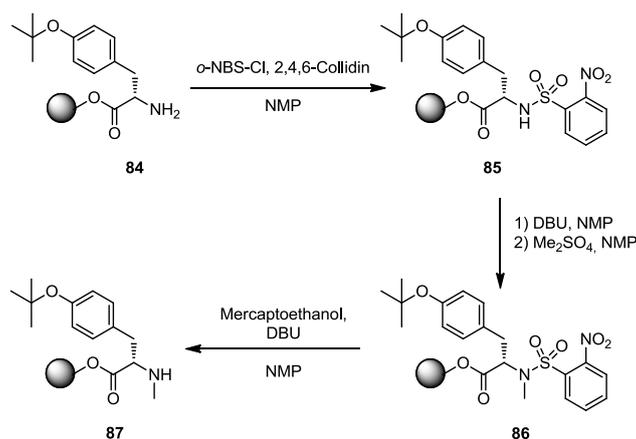


Schema II-12. Syntheseweg zur an Harz gebundenen Complestatin-Heptapeptid-Vorstufe **55**. Schwarz: durchgeführte Schritte; grau: geplante Schritte.

Die nächsten Schritte in der geplanten SPP-Synthese von **55** umfassten die Einführung von *N*-Alloc-*N*-Me-Tyr (**57**) zu **80**, dessen Entschützung und Verknüpfung mit dem nächsten Aminosäurebaustein zu Tripeptid **81**. Aufgrund der bereits beschriebenen Probleme bei der Darstellung von **57**, die auch auf eine schwierige Peptidbindungsknüpfung in der SPPS hindeuteten, sollten geeignete Bedingungen zur weiteren Funktionalisierung dieses Bausteins an einem vereinfachten Modellsystem erarbeitet

werden. Um also zu testen, ob und unter welchen Konditionen die Bindung zwischen dem *N*-methylierten Tyrosin und dem doppelt Chlorierten HPG an der festen Phase gebildet werden könnte, wurden zunächst SPPS-Kupplungsversuche zwischen *N*-Methyl-*O*-*tert*-butyl-L-tyrosin (**87**) und *N*-Alloc-3,5-dichlor-D-4-HPG (**58**) durchgeführt.

Für diese Testexperimente wurde kommerziell erhältliches Chlortritylchlorid-Harz, an dem bereits *O*-*tert*-Butyltyrosin gebunden war, benutzt. Um das am Harz gebundene Tyrosinderivat an der Aminogruppe zu methylieren, wurde die von Miller und Scanlan⁹⁵ entwickelte und von Kessler *et al.*⁹⁶ optimierte Methode der selektiven *N*-Methylierung von Peptidketten an der festen Phase angewendet. Bei der genannten Methode wird die zu methylierende Aminosäure zunächst mit *ortho*-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid an der Aminofunktion geschützt. Der nun zur Sulfonylgruppe benachbarte Stickstoff ist dadurch leichter zu deprotonieren. Im nächsten Schritt wird der Stickstoff mittels Dimethylsulfat selektiv einfach-methyliert. Anschließend wird die Nosyl-Schutzgruppe wieder abgespalten. Angewendet auf *O*-*tert*-Butyl-tyrosin (**84**) würde so über die Zwischenstufen **85** und **86** *N*-Me-*O*-*tert*-butyl-tyrosin (**87**) erhalten werden (Schema II-13).

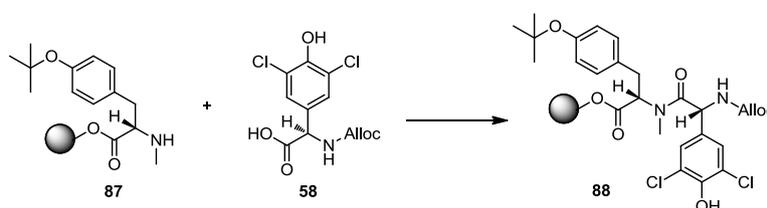


Schema II-13. Syntheseweg der *N*-Methylierung an der festen Phase am Beispiel von **84**.

Diese Reaktionsfolge wurde zunächst exakt nach der Literatur-Vorschrift durchgeführt, wobei jeder Schritt durch HPLC-Analyse beobachtet wurde.⁹⁶ Durch diese genaue Analyse konnten zwei der drei Schritte optimiert werden. So stellte sich heraus, dass der erste Schritt, die Nosylierung, eine Reaktionszeit von einer Stunde (statt nur 20 min) und 6 eq *o*-NBS-Cl (anstelle von 4 eq) erfordert. Als Base wurden 10 eq 2,4,6-Collidin verwendet. Die Bedingungen für die anschließende Methylierung wurden nicht verändert. Hierbei wurde das Harz mit der gebundenen Aminosäure zunächst 3 min mit 3 eq DBU und anschließend 2 min mit 10 eq Dimethylsulfat versetzt. Dies wurde nach Waschen des Harzes mit NMP wiederholt. Der letzte Schritt war die Abspaltung der Nosylgruppe. Der Literatur zufolge erfolgte dies, indem die Aminosäure am Harz zweimal mit 10 eq Mercaptoethanol und 5 eq

DBU 5 min zur Reaktion gebracht wird. Die HPLC-Beobachtungen zeigten jedoch, dass ein Durchlauf ausreicht, um die Nosylgruppe vollständig zu entfernen. Um zu prüfen, ob die Signale im HPLC-Chromatogramm eindeutig den Vorstufenmolekülen zugeordnet werden konnten, wurden von der ersten Stufe, *N*-Nosyl-*O*-*tert*-butyltyrosin (**85**), und von der zweiten Stufe, *N*-Nosyl-*N*-methyl-*O*-*tert*-butyltyrosin (**86**), ESI-MS-Messungen aufgenommen. Diese enthielten die entsprechenden Ionenpeaks. Die so optimierte *N*-Methylierung des Tyrosin-Bausteins an fester Phase stellt eine attraktive Alternative zur schwierigen Darstellung dieses Bausteins in flüssiger Phase dar.

Mit dem am Harz gebundenen *N*-Me-*O*-*tert*-butyl-tyrosin (**87**) wurde die Kupplung der nächsten Aminosäure **58** unter den üblichen Bedingungen mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und Diisopropylcarbodiimid (DIC) als Aktivatoren durchgeführt. Unglücklicherweise lieferte dieser Versuch nicht das gewünschte Dipeptid **88**. Die Reaktionskontrolle via HPLC-Analyse ließ keinen Hinweis auf eine Umsetzung des Edukts **87** erkennen. Bekannterweise ist die Peptidkupplung an einer *N*-methylierten Aminosäure durch die *N*-Methylgruppe erschwert. Die geeigneten Reaktionsbedingungen zur Aktivierung der Kupplungsreaktion zwischen *N*-Me-*O*-*tert*-butyl-tyrosin (**87**) und *N*-Alloc-3,5-dichlor-D-4-HPG (**58**) waren zu ermitteln. Hierzu wurden verschiedene Literaturstellen zur Hilfe gezogen, in denen ebenfalls Peptidkupplungen mit *N*-methylierten Aminosäuren aufgeführt waren.^{96,97,68,98} Die in Schema II-14 dargestellte Reaktion wurde unter den in Tabelle II-1 aufgelisteten Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt.



Schema II-14. Reaktionsschema zur gewünschten Peptidkupplung zwischen *N*-Methyl-*O*-*tert*-butyltyrosin (**87**) und *N*-Alloc-3,5-Dichlor-D-4-HPG (**58**).

Tabelle II-1. Getestete Reaktionsbedingungen der Peptidkupplungsreaktion aus Schema II-14.

	Kupplungsreagenzien	Base	Lösemittel	Reaktionszeit
1	DIC, HOBT	-/-	DMF	18h
2	HATU, HOAT	DIPEA	NMP	3h
3	COMU, Oxyma	DIPEA	DMF	2h
4	EDC, HOAT	NaHCO ₃	DMF	23h
5	PyBrOP	DIPEA	DMF	20h

Die Reaktionen wurden sowohl mittels HPLC- als auch HPLC-MS-Messungen untersucht. Da für die HPLC-Probenvorbereitung SPP-Harz-gebundene Substrate bzw Produkte durch 0.6 % ige TFA in Dichlormethan freigesetzt werden mussten, wurden auch die Bausteine, *N*-Alloc-HPG (**56**), *N*-Alloc-HPG-Cl₂ (**58**), *N*-Me-Tyr (**74**) und Indolderivat-OH **59**, mit 0.6 % iger TFA versetzt und Vergleichs-HPLC-Chromatogramme aufgenommen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die eingesetzten Aminosäuren sich bei der Behandlung mit 0.6 % igen TFA zersetzen. Die HPLC-Analysen zeigten bei allen Kupplungsreaktionen ein intensives Edukt-Signal. Ausschließlich das Chromatogramm der Reaktion mit den Bedingungen aus Eintrag 5 (Tabelle II-1) ließ die Entstehung eines Produktsignals erkennen (Abbildung II-1).

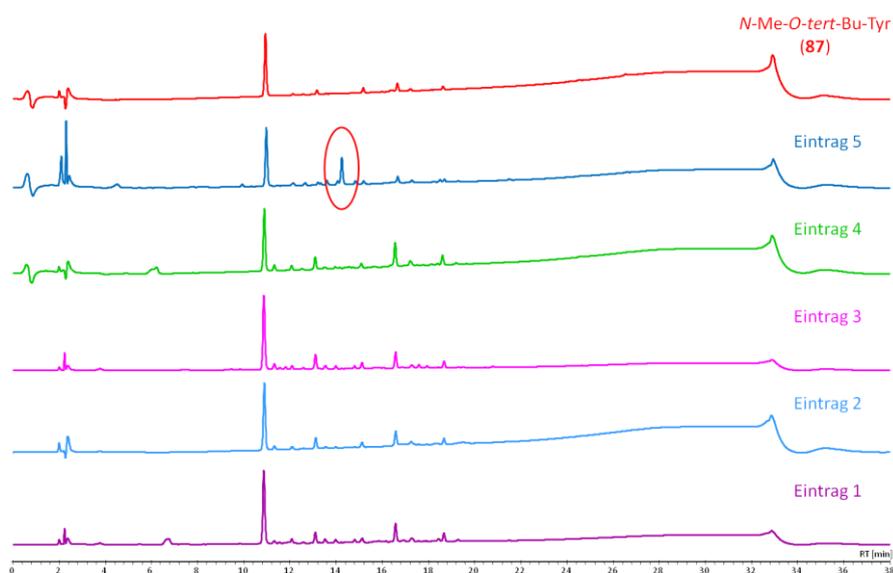


Abbildung II-1. HPLC-Chromatogramme zu der Reaktion aus Schema II-14 mit den Bedingungen aus Tabelle II-1.

Das Ergebnis der HPLC-MS-Analyse war vergleichbar mit dem Resultat der HPLC-Analyse. Der Ionenpeak mit $m/z = 552.1$ für die hydrolysierte Form von **88** war nur für die Kupplungsreaktion mit Bromo-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBrOP) als Kupplungsreagenz (Eintrag 5, Tabelle II-1) zu finden, jedoch in sehr geringen Spuren (Abbildung II-2). Der Haupt-LC-MS-Ionenpeak betrug $m/z = 538.3$ also 14 m/z weniger als der Wert der exakten Masse, 552.14 u, des zu synthetisierenden Dipeptids.

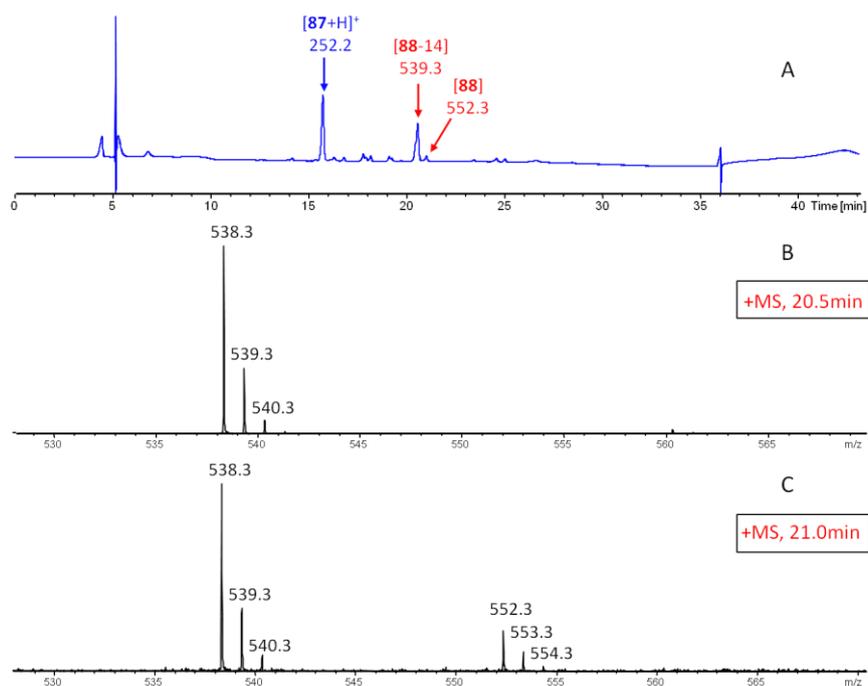


Abbildung II-2. HPLC-MS-Daten der PyBrOP-Reaktion (Eintrag 5 Tabelle II-1). A) UV-Spur; B) MS-Spektrum bei $t_R = 20.5\text{min}$; C) MS-Spektrum bei $t_R = 21.0\text{min}$

Trotz des Einsatzes von sowohl üblichen (z. B. HOBT, DIC) als auch speziellen Kupplungsreagenzien (z. B. PyBrOP) konnte keine effiziente Peptidbindung zwischen **87** und **58** erreicht werden. Für einen ausgiebigen Einblick, welche der beiden an der Kupplung beteiligten Aminosäuren die Ursache darstellt, wurde das Verhalten der beteiligten Aminosäuren **87** und **58** jeweils in Kupplungsreaktionen mit anderen Aminosäuren untersucht (Abbildung II-3).

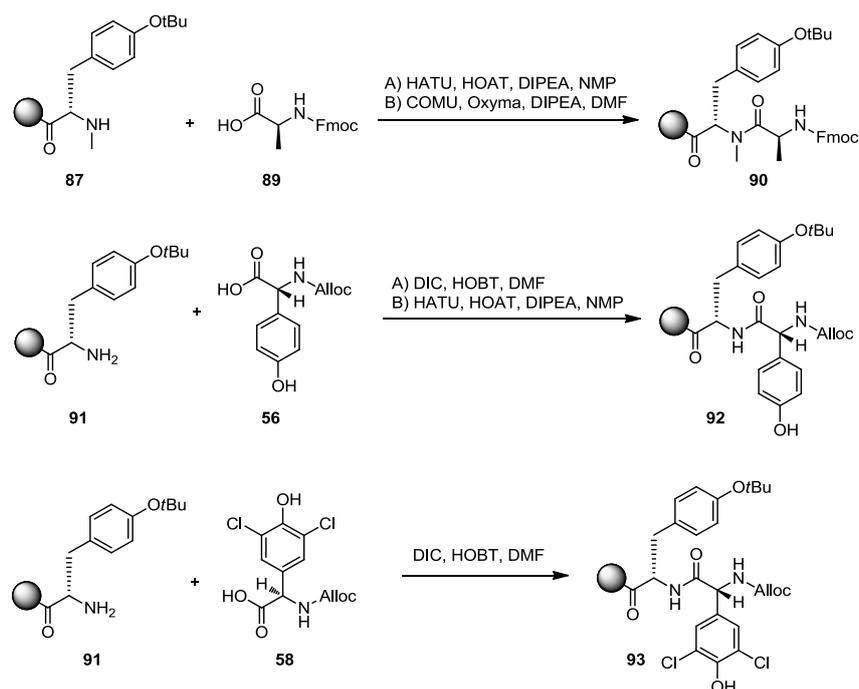


Abbildung II-3. Reaktionsschemen zu den Peptidkupplungen zwischen **87** und **89**, **91** und **56**, **91** und **58**.

In einem ersten Versuch wurde der Kupplungspartner von **87**, Alloc-Dichlor-HPG (**58**), durch Fmoc-L-Alanin (**89**) ersetzt. Es wurden die Kupplungsbedingungen in den Einträgen 2 und 3 (Tabelle II-1) angewendet. Die HPLC-Analyse zeigte, dass diese Kupplung unter den Bedingungen aus Eintrag 2 mit *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (HATU) und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAT) stattgefunden hat. Das Chromatogramm dieser Reaktion zeigte im Vergleich mit dem Edukt-Chromatogramm ein neues Signal auf (Abbildung II-4). Die Reaktion mit (1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidaminooxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphat (COMU) und Oxyma als Kupplungsreagenzien lieferte kein Produkt. Die Auswertung der LC-MS-Messung der HATU-Reaktion lieferte den Beweis für die Zuordnung des in Abbildung II-4 markierten Peaks zum Dipeptid **90-OH**. Die exakte Masse des Dipeptids beträgt 544.26 u. Das Massenspektrum wies die Ionen = 545.3 [M+H⁺], 567.2 [M+Na⁺], 1089.5 [2M+H⁺], 545.3 [2M+Na⁺] auf.

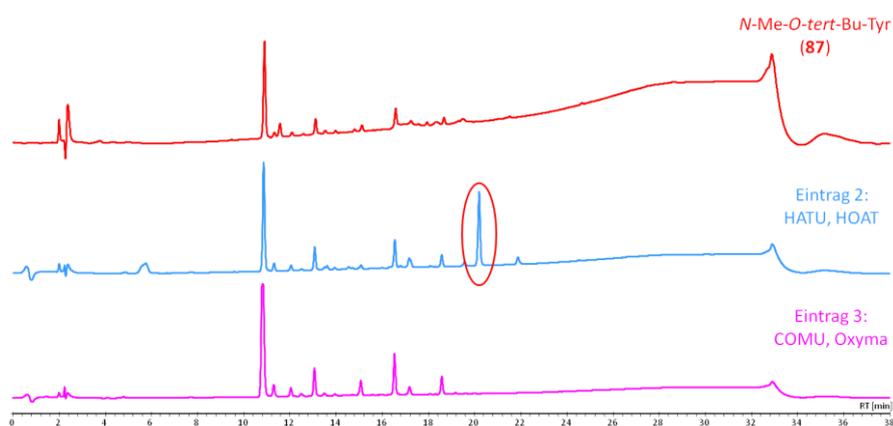


Abbildung II-4. HPLC-Chromatogramme zu der Kupplungsreaktion zwischen *N*-Me-*O*-*tert*-butyltyrosin (**87**) und Fmoc-L-Alanin (**89**).

Nachdem am Beispiel von Fmoc-Ala (**89**) gezeigt wurde, dass die Kupplung einer Aminosäure an *N*-Me-*O*-*tert*-butyl-tyrosin (**87**) prinzipiell möglich ist, wurde die Kupplungsreaktion zwischen *O*-*tert*-Butyltyrosin (**91**) und *N*-Alloc-HPG (**56**) analysiert. Diese Reaktion sollte aufgrund geringerer sterischer Hinderung durch die fehlende *N*-Me-Gruppe in **91** sowie durch die fehlenden Chlorid-Substituenten in **56** und die damit verbundene geringere Tendenz dieses Bausteins zur Racemisierung leichter in die Tat umzusetzen sein. Die hier ermittelten Reaktionsbedingungen sollten dann als Basis für weitere Testreaktionen mit den eigentlich benötigten Kupplungspartnern verwendet werden. Es wurden die Bedingungen aus Eintrag 1, DIC und HOBT, und Eintrag 2, HATU und HOAT, (Tabelle II-1) angewendet. Beide Reaktionsmöglichkeiten führten laut HPLC-Analyse zum Dipeptid **92** (Abbildung II-3). Unter denselben Bedingungen wurde schließlich die Testreaktion zur Reaktivität von **58** durchgeführt. Hierzu wurde erneut *O*-*tert*-Butyl-tyrosin (**91**) an fester Phase als Kupplungspartner genutzt (Abbildung II-3). Aus den HPLC-Chromatogrammen war bei beiden

Methoden eine Vielzahl an Peaks zu erkennen. Bei der Reaktion mit DIC und HOBT schien das Edukt **91** vollständig umgesetzt worden zu sein (Abbildung II-5). Interessanterweise waren für alle neu gebildeten Signale Doppelpeaks zu erkennen. Für einen tieferen Einblick wurden HPLC-MS-Daten zur Hilfe gezogen. Diese enthielten die gewünschten Ionenpeaks $m/z = 539.1$ [$M+H^+$], 561.1 [$M+Na^+$] des Rohprodukts. Sie waren dem in Abbildung II-5 markierten Doppelsignal zuzuordnen. Das Doppelsignal wies zusammen mit dem HPLC-MS-Ergebnis darauf hin, dass möglicherweise Diastereomere Produkte gebildet wurden. Eine Erklärung hierfür wäre zum einen eine Racemisierung des HPG-Rests während der Kupplungsreaktion. Zum anderen könnte das Alloc-Dichlor-HPG (**58**) während der zweistufigen Synthese epimerisieren. Bei der Alloc-Schützung wurde nämlich HPG-Cl₂ (**23**) 23 h mit NaHCO₃ umgesetzt. Da das α -Proton des HPG-Restes in direkter Nachbarschaft des Elektronen-ziehenden Benzolrings sehr acide ist, könnte unter diesen Bedingungen eine Epimerisierung eingetreten sein. Verbindung **58** könnte demnach als Enantiomergemisch eingesetzt worden sein, wodurch bei der Peptidkupplung Diastereomere entstehen würden. Alternativ könnte auch bei der Abspaltung des Produktes vom Harz Racemisierung eingetreten sein. Obwohl die Verknüpfung von **91** mit **58** also möglich zu sein scheint, zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass die Produktion von stereochemisch definiertem Dipeptid **93** auf diesem Weg schwer zu verwirklichen sein wird.

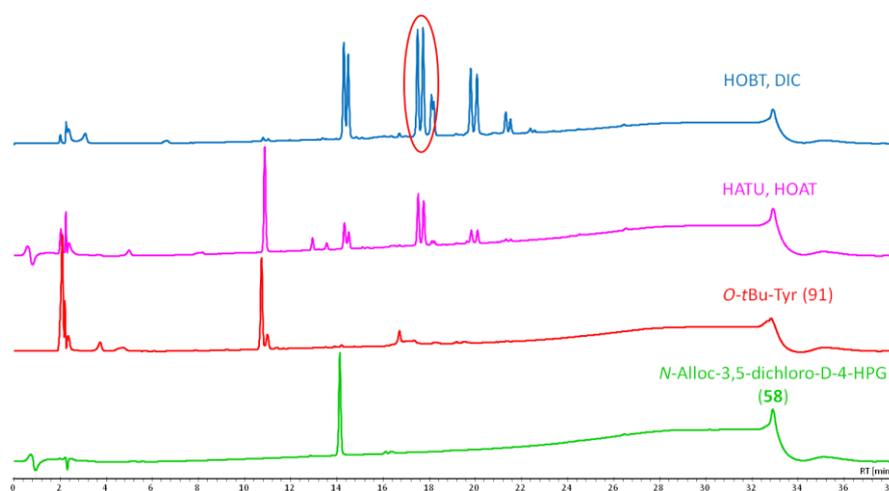
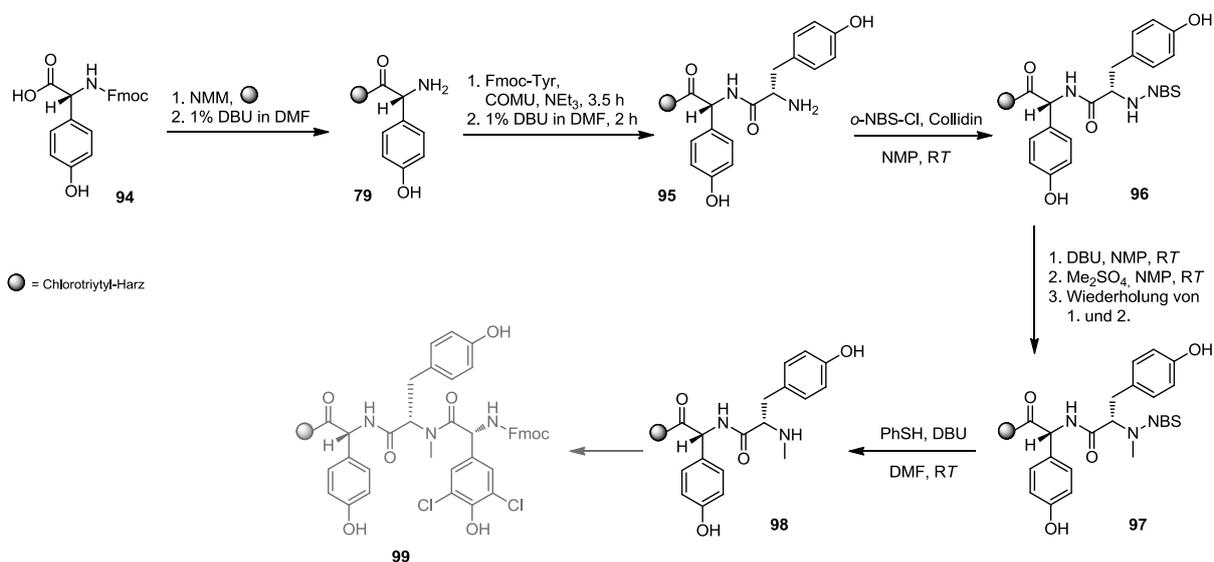


Abbildung II-5. HPLC-Chromatogramme zu der Kupplungsreaktion zwischen *O*-*tert*-Butyl-tyrosin **91** und Alloc-HPG-Cl₂ (**58**).
Blau: HOBT und DIC als Kupplungsreagenzien; pink: HATU und HOAT als Kupplungsreagenzien; rot: *O*-*tert*-Butyl-tyrosin **91-OH**; grün: Alloc-HPG-Cl₂ (**58**).

Die durchgeführten Testreaktionen machen deutlich, dass sowohl das ungünstige Nukleophil **87** mit einfachen Bausteinen, wie **89**, verknüpft werden kann, als auch das problematische Elektrophil **58** mit sterisch wenig anspruchsvollen Aminosäuren, wie **91**. Eine Peptidbindungsverknüpfung zwischen den beiden schwierigen Reaktionspartnern **87** und **58**, die für die chemo-enzymatische Synthese von

Complestatin (**13**) unerlässlich ist, scheint jedoch nicht praktikabel zu sein. Aus diesem Grund wurden die Bemühungen einer Synthese des linearen Vorläufers **48** an fester Phase zunächst eingestellt und an einem alternativen, konvergenten Syntheszugang in flüssiger Phase gearbeitet (s. Kapitel II.2, S.43).

Als 2014 Cryle *et al.* eine Fmoc-SPPS-Strategie für Moleküle, die zur Epimerisierung neigende Bausteine enthielten, publizierten,⁹⁹ wurde unser Interesse an der Festphasenpeptidsynthese erneut geweckt, und die SPPS-Versuche wieder aufgenommen. Diesmal sollten die Experimente mittels Fmoc-Schutzgruppenchemie durchgeführt und eine *N*-Methylierung an dem am Harz verlängerten Dipeptid **95** getestet werden (Schema II-15).



Schema II-15. Fmoc-SPPS mit HPG und *N*-Methylierung an Harz-gebundenem Dipeptid **95**.

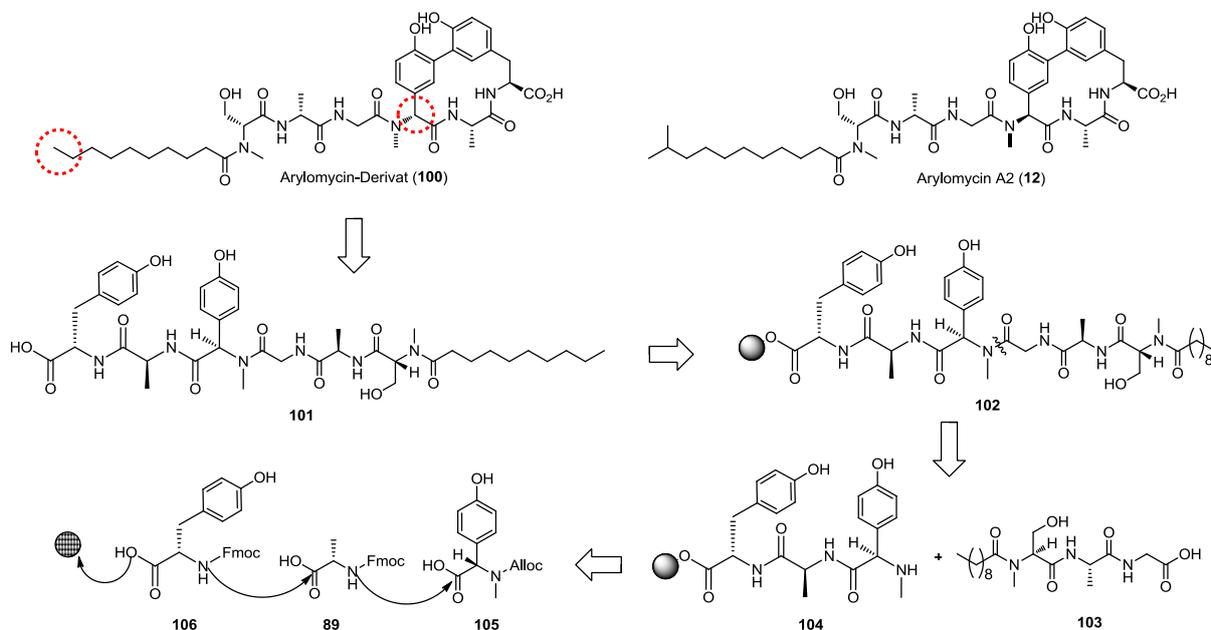
In den Arbeiten von Cryle *et al.*⁹⁹ werden die milde *N*-Fmoc-Entschützungs-methode mittels 1 %igem 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und einer Reaktionszeit von unter 30 Sekunden sowie die Verwendung von COMU und Triethylamin für die Peptidkupplungen mit einer Reaktionszeit von 30 Minuten als eine SPPS-Strategie beschrieben, bei der kaum Epimerisierung von HPG bzw. 3,5-Dihydroxyphenylglycin auftritt. Da Cryle *et al.* vorbeladenes Fmoc-Tyr-Wang-Harz für ihre Versuche verwendeten, die erste Aminosäure der linearen Sequenz von **48** jedoch D-4-HPG (**47**) ist, wurde vor der Anwendung dieser Strategie nach der oben beschriebenen Methode (Anfang dieses Kapitels) Fmoc-HPG (**94**) auf 2-Chlorotriptylchlorid-Harz mit einer für die Beladung einer festen Phase hervorragenden Ausbeute von 72 % geladen. Anschließend wurde wie von Cryle *et al.* beschrieben die *N*-Fmoc-Entschützung mittels 1 % igem DBU angesetzt. Obwohl der erste Durchlauf bereits 5 min (statt 30 s) dauerte, musste für eine quantitative Entschützung laut Fmoc-Test (vgl. Kapitel 19. und 20.1.9.) der Versuch wiederholt werden, um **79** zu erhalten (Schema II-15). Auch die folgende

Peptidkupplung mit *N*-Fmoc-L-Tyrosin erforderte eine längere Reaktionszeit als von Cryle *et al.* angegeben (3.5 h statt 30 min). Die anschließende Entschützung zu **95** wurde mit einer Reaktionszeit von 2 h (statt 30 s) durchgeführt. Im Anschluss wurde die zuvor an Tyrosin angewendete Methode der *N*-Methylierung an der festen Phase auch an Dipeptid **95** getestet. Nach der NBS-Schützung der Amino-Funktion wurde **96** erfolgreich am Stickstoff der Aminogruppe des Tyrosin-Restes methyliert, wobei **97** produziert wurde. Für die Entfernung der NBS-Schutzgruppe mittels Thiophenol und DBU war darauf zu achten, dass die Reaktion unter Schutzgas-Atmosphäre stattfand, da sonst eine Dimerisierung des Thiophenols beobachtet wurde (mittels HPLC-Analyse). Die anschließende Kupplung von *N*-Fmoc-3,5-dichlor-D-4-HPG an **98**, um **99** zu erhalten, konnte nicht durchgeführt werden, da die Generierung des *N*-Fmoc-3,5-dichlor-D-4-HPG sich komplizierter erwies als erwartet (nicht gezeigt). Da die mögliche „Epimerisierungs-freie“ Fmoc-SPPS-Strategie erst gegen Ende dieser Arbeit veröffentlicht wurde und im Verlauf der Arbeit eine andere Strategie (vgl. Kapitel II.2) für die Synthese von **48** etabliert wurde, wurde aus zeitlichen Gründen die Versuche der Fmoc-SPPS von **48** nicht mehr fortgeführt. Letztendlich konnte durch die erneute Aufnahme der SPPS-Versuche die Strategie der *N*-Methylierung an der festen Phase nicht nur am Beispiel einer einzelnen Aminosäure, sondern auch an einem Dipeptid erfolgreich verifiziert werden. Zudem wurde eine Beladung des Harzes mit einer hohen Ausbeute von 72 % erreicht.

Trotz der bereits erschienen Arbeiten von Robinson *et al.*⁹⁰ und Cryle *et al.*⁹⁹ zur SPPS von vereinfachten, linearen Peptiden des Vancomycin-Typs war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, eine effektive SPPS-Route zur strukturell hoch komplexen Complestatin-Vorstufe **48** zu erarbeiten. Dabei fällt auf, dass in den genannten Publikationen jeweils auf die auch in Vancomycin enthaltene *N*-Methylgruppe und die Chlor-Substituenten an den HPG-Einheiten verzichtet wurde.^{90,99} Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sind aber gerade diese Substituenten in der SPPS höchst problematisch. Insbesondere die in der Complestatin-Synthese nötige Verknüpfung des schlechten Nucleophils *N*-Me-Tyr (**74**) mit dem hoch-empfindlichen Elektrophil 3,5-Dichlor-HPG (**23**) macht es daher praktisch unmöglich, die SPPS auf das Zielmolekül **13** anzuwenden. Dies würde aller Wahrscheinlichkeit nach auch für eine SPPS der echten Vancomycin-Vorstufe gelten und erklärt somit möglicherweise, warum bislang nur entsprechend vereinfachte Strukturen per SPPS synthetisiert wurden.^{90,99}

II.1.2. SPPS einer linearen Vorstufe des Arylomycin-Typs

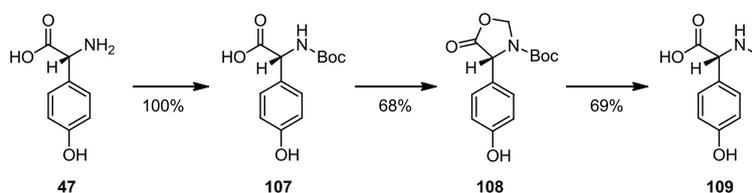
Die antibiotischen Arylomycine (wie **12**) gehören - wie das Complestatin (**13**) - zu der Naturstoffklasse der nicht-ribosomalen BEPs. Die chemo-enzymatische Totalsynthese von Arylomycinen und deren Derivate ist ein weiteres Ziel unserer Arbeitsgruppe. Im Verlauf dieser Arbeit sollte eine Methode für die Synthese der linearen Vorstufe von Arylomycinen über die SPPS entwickelt werden, damit diese als Substrate für die enzymatische Ringbildung mit Hilfe des oxidativen Cytochrom-P450-Enzyms AryC¹⁰⁰ dienen können. Dabei wurde die Etablierung einer effizienten Synthesestrategie angestrebt, die auch durch einfachen Tausch von Bausteinen die Herstellung von Arylomycin-Derivaten ermöglichen sollte. Für die Entwicklung dieser Methode wurde ein Arylomycin-Derivat **100** gewählt, dessen Bausteine leicht zugänglich waren (Schema II-16). Zum einen wurde die unverzweigte Decansäure als Fettsäurerest eingesetzt und zum anderen wurde statt des L-HPG-Bausteins die D-Konfiguration verwendet, weil D-4-HPG (**D-47**) erheblich kostengünstiger ist. Die lineare Peptidkette **101** sollte am 2-Chlortritylchlorid-Harz aufgebaut werden, um **102** zu erhalten. Retrosynthetisch wurde dieses in zwei Fragmente unterteilt, wobei das am Harz gebundene Tripeptid **104** angefangen mit *N*-Fmoc-L-Tyrosin (**106**) und durch aufeinanderfolgende Kupplungen von *N*-Fmoc-L-Alanin (**89**) und *N*-Alloc-*N*-methyl-D-4-HPG (**105**) synthetisiert werden sollte. Parallel dazu sollte von Frau Hanna Hong aus unserer Arbeitsgruppe der Lipopeptidbaustein **103** in der flüssigen Phase hergestellt werden. Anschließend sollten beide Hälften an der festen Phase zu **102** gekuppelt werden.



Schema II-16. Retrosynthetische Darstellung der SPPS der linearen Vorstufe **101** des Arylomycin-Derivats **100**.

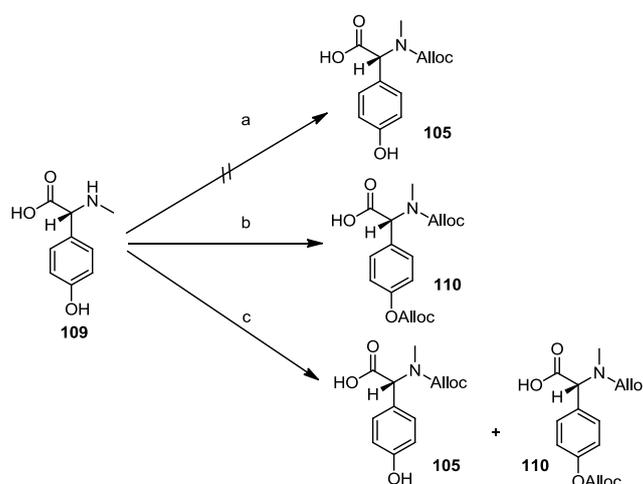
II.1.2.1. Synthese der Bausteine für die SPSS von Arylomycin-Derivat 101

Für die Synthese von **101** musste lediglich der Baustein **105** hergestellt werden. **106** und **89** waren kommerziell erhältlich. Genauso wie die Alloc-Schutzung des *N*-Me-Tyr (**74**) stellte auch die Synthese von *N*-Alloc-*N*-Me-HPG (**105**) eine große Herausforderung dar. Die Experimente, welche für die Synthese von *N*-Alloc-*N*-Me-Tyr (**57**) durchgeführt wurden, wie z. B. die Umsetzung der Alloc-geschützten bzw. *N*-Alloc- und *O*-Methyl-geschützten Aminosäure mit Natriumhydrid und Iodmethan (vgl. Kapitel 3.1.1.), wurden parallel auch für die Herstellung von **105** durchgeführt. Die erfolgversprechendste Syntheseroute war jedoch wie im Fall von Tyrosin jene, in der die Aminosäure zuerst methyliert und anschließend Alloc-geschützt wurde. Hierfür wurde *N*-Me-HPG (**109**) zu 69 % aus *N*-Boc-HPG-Oxazolidinon (**108**) gewonnen, welches durch die Behandlung von *N*-Boc-HPG (**107**) mit Paraformaldehyd in einer Ausbeute von 68 % hergestellt wurde (Schema II-17).



Schema II-17. Synthese von *N*-Methyl-D-4-HPG **109** über die Oxazolidinon-Zwischenstufe **107**.

Die Einführung der Alloc-Schutzgruppe erforderte mehrere Optimierungsversuche, weil entweder keine Reaktion stattfand oder ausschließlich die di-geschützte Form **110** gebildet wurde, wenn der Alloc-Überträger und die Base direkt in einer Portion zugegeben wurden (Schema II-18).



Schema II-18. Optimierungsversuche der Reaktionsbedingungen für die Synthese von *N*-Alloc-*N*-Me-HPG (**105**). a) 1.0 eq Alloc-OSu, 1.0 eq NaHCO₃(s), Aceton/H₂O 1:1, RT; b) 1.5 eq Alloc-Cl, 2.0 eq NaOH(aq) bzgl. **109**-Rohprodukt, Dioxan, 0 °C, RT. c) wie b) aber mit Stöchiometrie bzgl. im Rohprodukt tatsächlich enthaltenem **109**-Anteil (mittels ¹H-NMR berechnet).

Auch hier (wie bei *N*-Me-Tyr) wurde zunächst mit Triethylsilan verunreinigtes *N*-Me-HPG (**109**) eingesetzt. Die Alloc-chlorid- sowie die NaOH-Menge wurde auf den mit Hilfe des ^1H -NMR-Spektrums berechneten *N*-Me-HPG-Anteil angepasst. So konnte die Bildung von **105** erreicht werden, jedoch wurde ein 1:3-Gemisch aus mono- (**105**) und di- (**110**) geschütztem *N*-Me-HPG erhalten (Schema II-18). Um die zweifache Schützung zu verhindern, wurde die Alloc-chlorid-Dioxan-Lösung in fünf Portionen zugegeben, wobei die erste Portion bei 0 °C und die nächsten bei Raumtemperatur und in stündlicher Abfolge zugegeben wurden. Außerdem wurde der Anteil der Base (2.0 eq) wieder auf die eingesetzte Menge an Rohprodukt **109** eingestellt, um sicher zu gehen, dass ausreichend Base in der Reaktionslösung enthalten ist, falls sie von Verunreinigungen verbraucht wird. Diese Bedingungen lieferten zwar ausschließlich das gewünschte Produkt **105** jedoch mit einer Ausbeute von lediglich 9%. Hier stellte sich die Frage, ob die Monosubstitution an dem Amin-Stickstoff oder dem phenolischen Sauerstoff erfolgte. Der Unterschied des ^1H -NMR-Spektrums zwischen dem *N*-geschützten und dem *O*-geschützten Produkt liegt in der NMR-Verschiebung der aromatischen Protonen. Durch eine Substitution am phenolischen Sauerstoff kann dieser keinen +*M*-Effekt (positiver mesomerer Effekt) ausüben, womit sich die vier Protonen am Aromaten ähnlicher sind und die entsprechenden Peaks im ^1H -NMR-Spektrum näher zusammen liegen. Das Fehlen der elektronenschiebenden Wirkung des phenolischen Sauerstoffs würde zudem eine Tieffeld-Verschiebung der aromatischen Protonensignale zur Folge haben. Anhand des grün gefärbten ^1H -NMR-Spektrums in Abbildung II-6 ist zu erkennen, dass die Mono-Substitution im entstandenen Produkt tatsächlich an der erwarteten *N*-Position stattgefunden hatte.

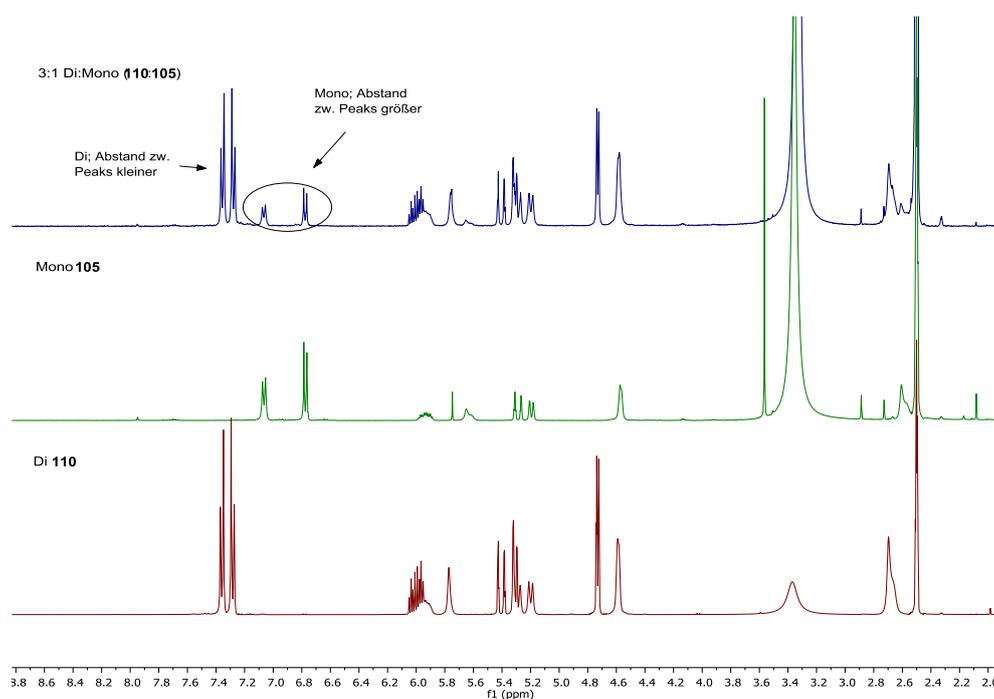
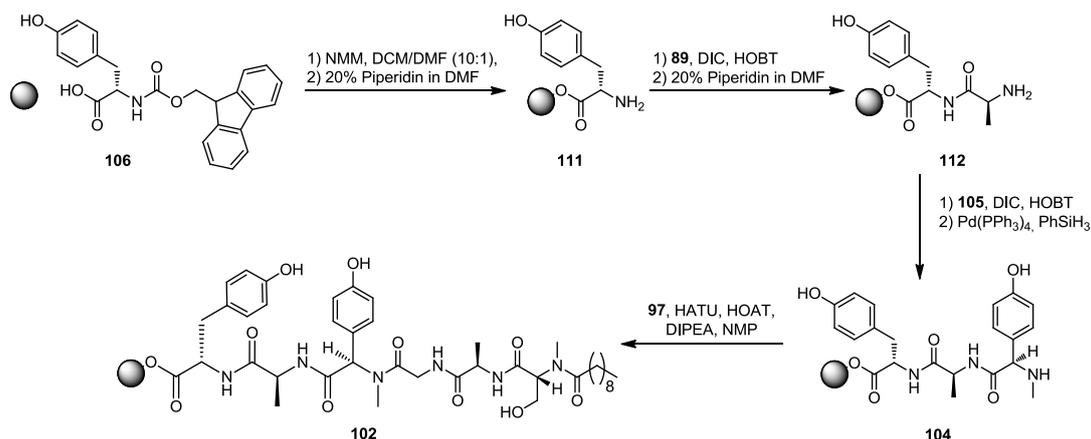


Abbildung II-6 Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von **105** und **110**.

Zur Erhöhung der Ausbeute wurden Alloc-*N*-hydroxysuccinimidester anstelle von Allocchlorid und ein Aceton-Wasser- anstelle eines Dioxan-Wasser-Gemisches als Lösungsmittel erprobt. Als Base wurde Natriumhydrogencarbonat eingesetzt. Mit diesen Bedingungen wurde das gewünschte Produkt **105** in einer guten Ausbeute von 76 % jedoch im 17:1 Mono-Di-Verhältnis produziert. Um ausschließlich das einfach geschützte Produkt zu bilden, wurden die Zeitintervalle der Alloc-Zugabe von 1 h auf 2 h erhöht. Das Resultat hiervon war ein 3:1 Mono-Di-Gemisch, wobei die Ausbeute des Mono-Produkts **105** 63 % betrug. Als schließlich die Reinigung des *N*-Me-HPGs **109** durch Umkristallisation aus Aceton gelungen war, konnte reines Edukt mit Alloc-OSu und Natriumhydrogencarbonat in Aceton/Wasser umgesetzt werden. Somit konnte letztendlich hauptsächlich das gewünschte Produkt **105** in einer akzeptablen Ausbeute von 57 % erhalten werden. Das di-geschützte Derivat **110** entstand dabei nur in Spuren. Das Triethylsilan, das durch die Umkristallisation entfernt werden konnte, stellte sich somit als der Hauptstörfaktor dieser Schützungsreaktion heraus. Da die Ursache der Gemischbildung bekannt und behoben war, wurde eine Erhöhung der Ausbeute dieser Reaktion angestrebt. Eine Verlängerung der Reaktionszeit von 16 h auf 46 h führte zur Verbesserung der Ausbeute von 57 % auf 85 %. Mit der verbesserten Ausbeute der Alloc-Schätzung ergibt sich für die vierstufige Synthese des Bausteins **105** eine Gesamtausbeute von 40 %.

II.1.2.2. SPPS der linearen Vorstufe des Arylomycin-Derivats 101

Den Anfang der Festphasenpeptidsynthese der linearen Vorstufe **101** bildete das Beladen des 2-Chlortritylchlorid-Harzes mit der ersten Aminosäure **106**, nachdem das Harz durch die Behandlung mit Thionylchlorid aktiviert wurde (s. Schema II-11). Dabei konnte *N*-Fmoc-L-Tyrosin (**106**) zu 39 % an das Harz gebunden werden. Nach der Befreiung der Aminogruppe von der Fmoc-Schutzgruppe mit Hilfe von Piperidin, wurde **111** mit Fmoc-Ala (**89**) gekuppelt und zum freien Dipeptid **112** umgesetzt. Die Addition von *N*-Alloc-*N*-Me-HPG (**105**) stellte die letzte Kupplung einer einzelnen Aminosäure dar. (Schema II-19).



Schema II-19. Syntheseweg zur an Harz gebundenen Arylomycin-Vorstufe **102**.

Bis zu der linearen Vorstufe **102** fehlten eine Pd-katalysierte Alloc-Entschützung und eine letzte Kupplungsreaktion. Bevor die zwei Hälften **104** und **103** zusammengefügt wurden, wurden über eine Testreaktion zwischen **104** und Fmoc-Ala (**89**) geeignete Kupplungsbedingungen ermittelt. Das Tripeptid **Alloc-104** wurde jedoch mehrere Monate bei 4 °C gelagert, bis es für diese Reaktionen verwendet werden konnte. Zur Überprüfung der Haltbarkeit von **Alloc-104** sowie von dessen Vorstufe **112** wurden HPLC-MS-Analysen durchgeführt. Diese zeigten, dass sich das freie Dipeptid **112** anscheinend in geringen Mengen zersetzt hatte. Das HPLC-Chromatogramm enthielt im Vergleich zum Chromatogramm der frisch hergestellten Probe weitere, weniger intensive Signale. Es wurde angenommen, dass es sich um Zersetzungsprodukte handelt, da z. B. die ungeschützte Aminogruppe des Alanins die Carboxylgruppe des Tyrosins nukleophil angreifen könnte, wodurch ein Diketopiperazin entstehen würde. Das *N*-geschützte Peptid **Alloc-104** schien jedoch stabil zu sein und wurde für die Testkupplung mit Fmoc-L-Ala (**89**) verwendet. Hierzu wurde das Tripeptid **104** mittels Pd-Katalysator und Phenylsilan von der Alloc-Schutzgruppe befreit. Die Kupplungsreaktion wurde unter zwei verschiedenen Kupplungsbedingungen durchgeführt (Schema II-20).



Schema II-20. Reaktionsbedingungen zur Testreaktion zwischen Tripeptid **104** und Fmoc-Ala (**89**).

Die Umsetzung zum gewünschten Produkt **113** konnte für beide Kupplungsmethoden via HPLC und HPLC-MS beobachtet werden. Das Chromatogramm der Testkupplung unter Einsatz von HOBT und DIC in DMF zeigte mehrere neue Signale auf (nicht gezeigt). Über HPLC-MS-Analyse konnte eines der Signale dem gewünschten Tetrapeptid **113** zugeordnet werden. Die zweite Methode, bei der HATU

und HOAT als Kupplungsreagenzien und DIPEA als Base verwendet wurden, wies ein Chromatogramm mit lediglich einem Signal auf, dessen Retentionszeit mit der des Produktsignals aus dem Chromatogramm der ersten Methode übereinstimmte (nicht gezeigt). Aufgrund dieser selektiven Bildung des gewünschten Produkts **113** wurden in der Kupplung von **103** mit **104** ebenfalls HATU und HOAT verwendet. Dabei wurde jedoch die wertvolle, synthetisch hergestellte Verbindung **103** nur in einem geringen Überschuss von 1.19 eq statt 3.00 eq eingesetzt. Aus diesem Grund wurde die Reaktionszeit von 3 h auf 19 h verlängert. Das HPLC-Chromatogramm zu dieser Testreaktion wies mehrere Produkte auf. Den Beweis für eine erfolgreiche Umsetzung zum Heptapeptid **102** lieferte eine HPLC-MS-Analyse, bei der der Ionenpeak mit dem erwarteten $m/z = 799.5$ für $[M + H]^+$ detektiert werden konnte (Abbildung II-7).

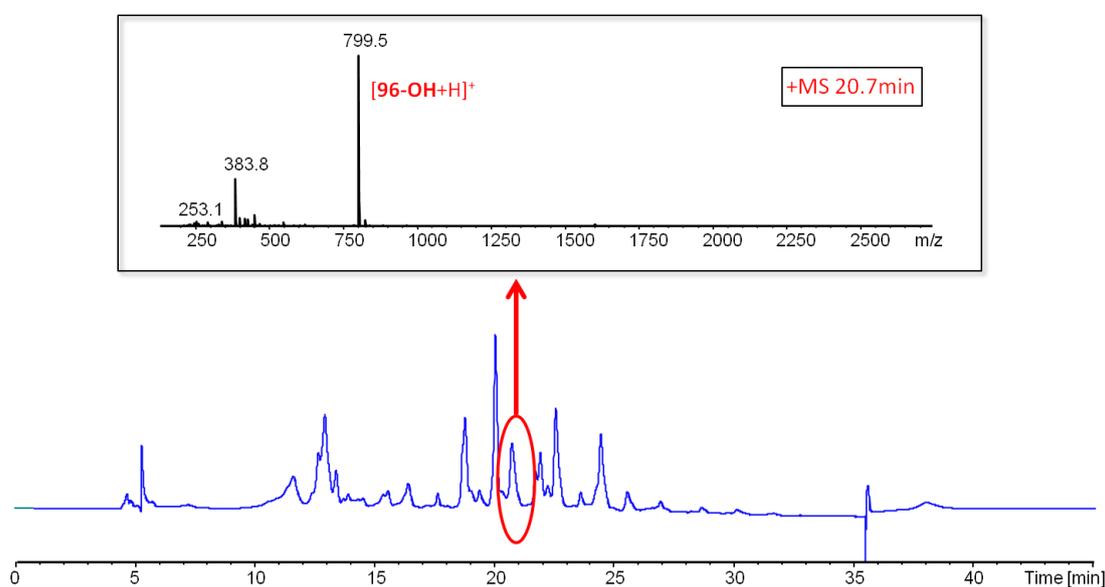


Abbildung II-7. HPLC-MS-Daten vom dem Kupplungsversuch zwischen dem Harz-gebundenen Tripeptid **104** und dem Lipopeptid-Baustein **103**. Unten: HPLC-Chromatogramm; oben: Massenspektrum für das in dem HPLC-Chromatogramm rot markierte Signal.

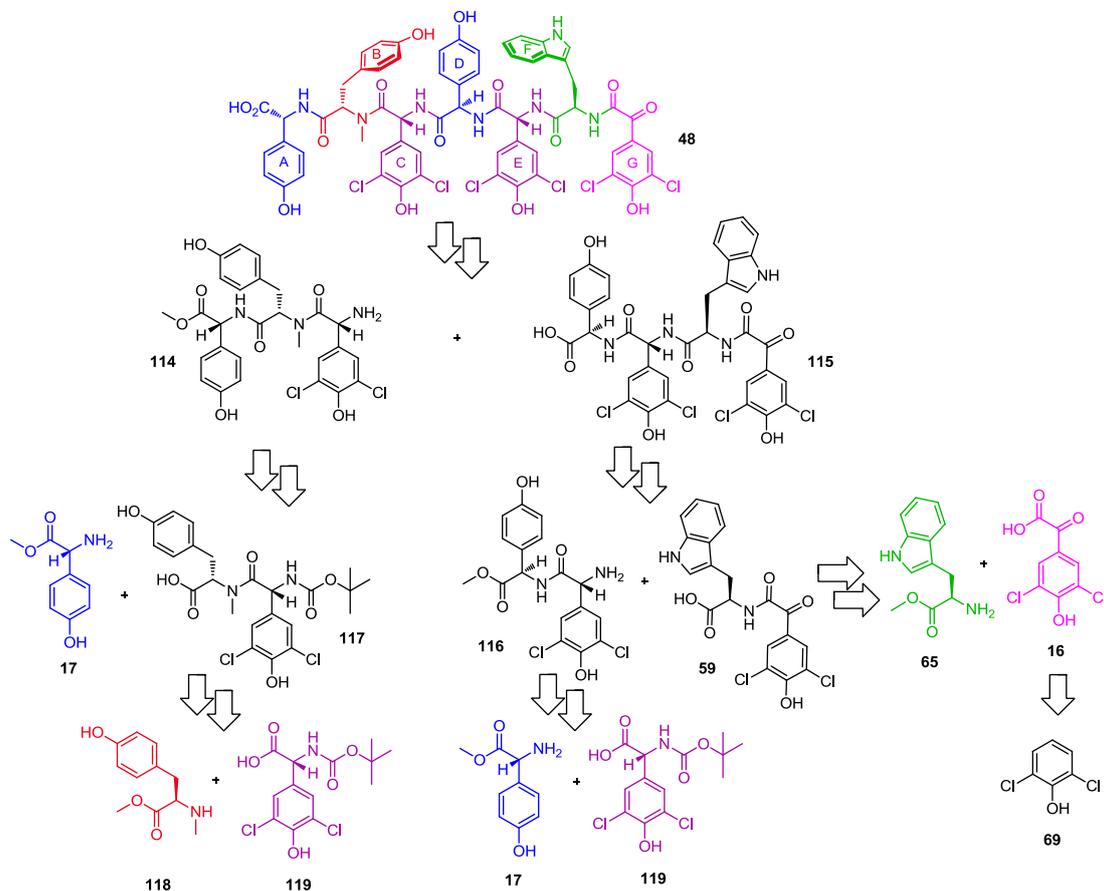
Die lineare Vorstufe **101** wurde durch die Einwirkung von TFA von der festen Phase gelöst und über eine semipräparative HPLC-Trennung in 15 % Ausbeute isoliert. Das Lipopeptid **103** stellt zwar keinen natürlichen Baustein der Arylomycin-Gruppe dar, war jedoch leicht zugänglich und daher sehr gut für die Entwicklung der Synthesemethode geeignet. Außerdem könnte das Endprodukt **100** als ein neues Arylomycin-Derivat auf biologische und pharmazeutische Aktivität überprüft werden.

Fortführende Arbeiten zu den Arylomycin-Derivaten werden in unserer Gruppe durch andere Mitarbeiter durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Grundlage für dieses Projekt gelegt werden, nämlich die Entwicklung einer schnellen Synthesemethode an der festen Phase für die lineare Vorstufe von Verbindungen des Arylomycin-Typs.

II.2. Flüssigphasenpeptidsynthese

II.2.1. Peptidsynthese der linearen Vorstufe von Complestatin (13) in der Flüssigphase

Die anfängliche Idee, die Biosynthese des Complestatins (13) nachzuahmen und mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese die lineare Vorstufe 48 Baustein für Baustein aufzubauen, bereitete bei der Anknüpfung des dritten Bausteins 58 Probleme. Der Grund hierfür schien hauptsächlich verstärkte sterische Hinderung zu sein, ausgelöst durch die *N*-Methylgruppe an Tyrosin, sowie die Empfindlichkeit von *N*-Alloc-HPG-Cl₂ (58) gegenüber Racemisierung. Alternativ sollte daher eine Flüssigphasenpeptidsynthese (engl. Liquid Phase Peptide Synthesis, kurz: LPPS) entwickelt werden. Diese Strategie sollte zudem den Vorteil bieten, dass die Peptidsequenz in zwei Hälften 114 und 115 geteilt und diese konvergent synthetisiert werden konnten. Dabei sollte 114 über die Bindung von HPG-Methylester (17) an das Dipeptid 117 gebildet werden, während 115 durch eine Peptidkupplung zwischen den Dipeptiden 116 und 59 aufgebaut werden sollte. Die Ausgangsstoffe für die Bausteine 17, 118, 119 und 65 sollten die entsprechenden Aminosäuren sein, wobei nur Tyrosin in der proteinogenen L-Konfiguration vorliegt. Der Ausgangsstoff 2,6-Dichlorphenol (69) war Ketosäure 16 (Schema II-21).

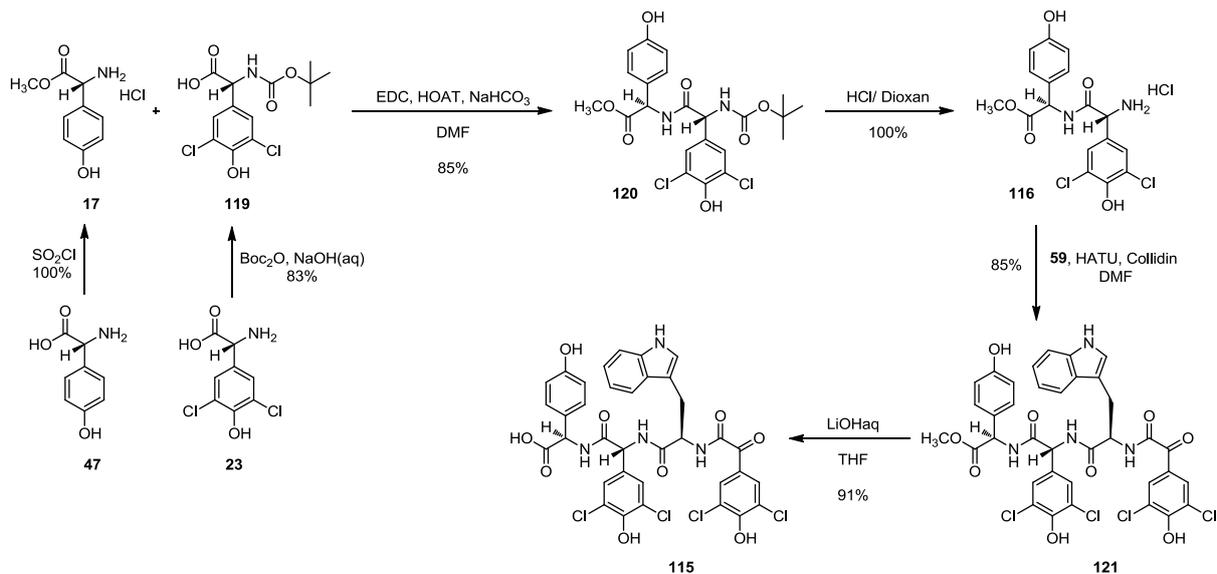


Schema II-21. Retrosynthetische Darstellung der LPPS der linearen Complestatin-Vorstufe 48.

Da nicht mehr auf eine säurelabile feste Phase geachtet werden musste, wurde die Alloc-Schutzgruppe durch die leichter und kostengünstiger zu entfernende Boc-Schutzgruppe ersetzt. Außerdem mussten für die LPPS auch die Säuregruppen geschützt werden. Das bedeutete, dass die für die SSPS hergestellten Bausteine in der flüssigen Peptidsynthese nicht verwendet werden konnten, und somit alle Bausteine, bis auf das Indol-Derivats **59** (vgl. Kapitel II.1.1.1), noch zu synthetisieren waren.

II.2.1.1. LPPS des Tripeptids 115

Den Anfang der Synthese von **115** bildete die Kupplung zwischen D-4-HPG-methylester (**17**) und *N*-Boc-D-4-HPG-Cl₂ (**119**) zum Dipeptid **120**. Verbindung **119** konnte durch die Boc-Schätzung von HPG-Cl₂ (**23**) mit Hilfe von Di-*tert*-Butyldicarbonat und Natriumhydrogencarbonat in einer guten Ausbeute von 83 % erhalten werden. Für die Realisierung dieser Peptidbindungsknüpfungen wurden zunächst die von Hoveyda *et al.* in der Totalsynthese von Chlorozeptin I, ein Complestatin-Derivat, angewendeten Reaktionsbedingungen getestet.⁶⁸ Diese schienen mit Ausbeuten zwischen 74 und 86 % für Peptidkupplung mit Seitenketten-geschützten Aminosäuren gut zu funktionieren. Außerdem sollte durch die eingesetzten milden anorganischen als auch organischen Basen einer Epimerisierung an den HPG-Bausteinen vorgebeugt werden. Dennoch waren einige Optimierungsversuche erforderlich, um die optimalen Reaktionsbedingungen mit den bestmöglichen Ausbeuten zu ermitteln (Tabelle II-2). Die Kupplung zwischen HPG-methylester (**17**) und *N*-Boc-3,5-dichlor-HPG (**119**) lieferte mit 85 % die höchste Ausbeute, wenn 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid (EDC HCl) und HOAT als Aktivierungsreagenzien sowie NaHCO₃ als Base verwendet wurden. Dabei stellte die Auswahl des Lösungsmittels einen entscheidenden Faktor dar. Während ein Gemisch aus THF und DMF eine mäßige Ausbeute von 57 % ergab, führte DMF allein zu einer Ausbeute von 80 bis 85 %.



Schema II-22. Synthese des Tripeptids **115**.

Tabelle II-2. Für die Peptidkupplung zwischen **17** und **119** getestete Reaktionsbedingungen.

Eintrag	Kupplungsreagenzien	Base	Bedingungen	Lösungsmittel	Ausbeute
1	HATU	Collidin	0°C, 1h, RT, 2 h	THF/DCM	21 %
2	HATU	Collidin	0°C, 1h, RT, 47 h	THF/DCM	21 %
3	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 25.5 h	THF/DMF	57 %
4	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 0.5 h	DMF	80 %
5	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 50 min	DMF	83 %
6	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 13 h	DMF	85 %

Nach quantitativer Boc-Entschützung durch 4 N HCl in Dioxan Lösung sollte Indol-Derivat **59** an das freie Dipeptid **116** gebunden werden. Die Peptidbindungsknüpfung ließ sich mittels HATU und Collidin in einem Lösungsmittelgemisch aus THF und DCM in einer Ausbeute von 60 % realisieren, die höchst erzielte Umsetzung der getesteten Bedingungen (Tabelle II-3). Dies galt für einen Reaktionsansatz von 0.22 mmol **116**. Als der Ansatz auf 1.20 mmol erhöht wurde, konnte lediglich ein Umsatz von 11 % erhalten werden. Reproduktionsversuche in dem bereits erfolgreich umgesetzten kleinen Maßstab blieben mit 4 bis 6 % ohne erwähnenswerte Bildung des Tetrapeptids **121**. Der Wechsel des Lösungsmittels auf DMF war schließlich die Lösung des Problems. Dadurch konnte eine Steigerung der Ausbeute auf 85 % erzielt werden, die nicht nur für sehr kleine Ansätze

reproduzierbar war. Das Tetrapeptid **121** wurde mit LiOH in 91 % Ausbeute zur rechten Seite **115** der Complestatin-Vorstufe **48** hydrolysiert (Schema II-22).

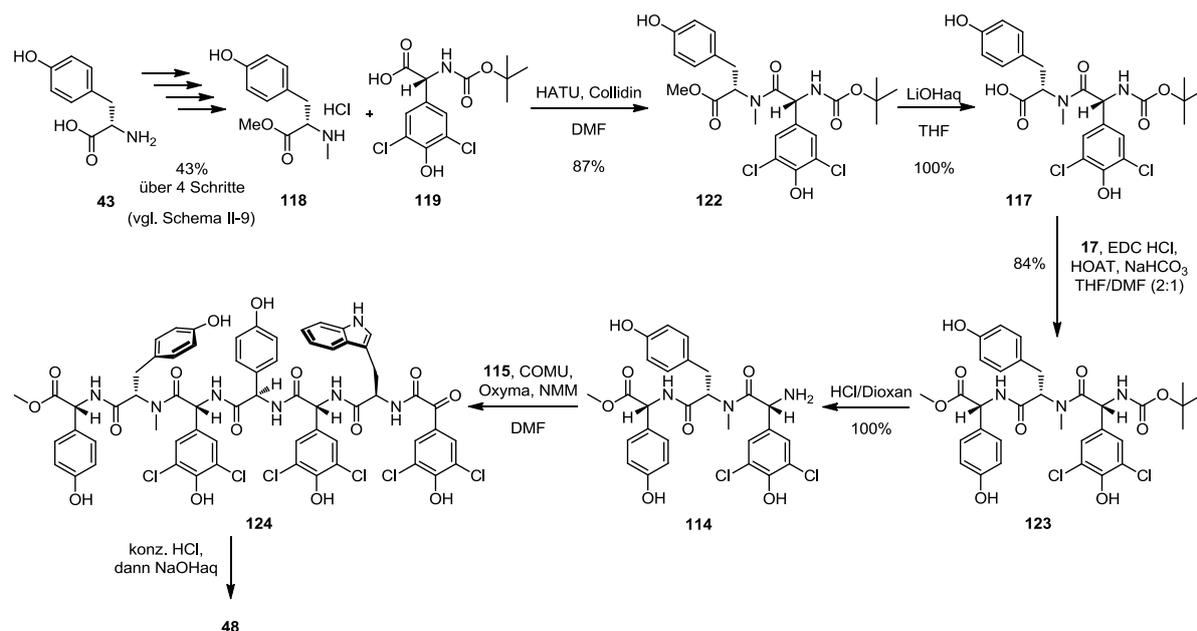
Tabelle II-3. Für die Peptidkupplung zwischen **116** und **59** getestete Reaktionsbedingungen.

Eintrag	Kupplungsreagenzien	Base	Bedingungen	Lösungsmittel	Ausbeute
1	HATU	Collidin	0°C, 2 h, RT, 21 h	THF/DCM	>100 % ^a , 48 % ^b
2	HATU	Collidin	0°C, 2 h, RT, 24 h	THF/DCM	60 %
3	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 22 h	DMF	0 %
4	HATU	Collidin	0°C, 2 h, RT, 21.5 h	THF/DCM	11 % (gr. Ansatz)
5	HATU	Collidin	0°C, 2 h, RT, 21.5 h	THF/DCM	4 %
6	HATU	NMM	0°C, 2 h, RT, 17 h	THF/DCM	6 %
7	HATU	NMM	0°C, 2 h, RT, 46 h	DMF	85 %

a) Enthält noch Lösungsmittel. b) Ausbeute, berechnet nach quantitativer Hydrolyse.

II.2.1.2. LPPS der linearen Complestatin-Vorstufe **48**

Das Dipeptid **117** setzte sich aus *N*-Methyl-L-tyrosinmethylester (**118**) und *N*-Boc-3,5-dichlor-D-4-HPG (**119**) zusammen, wobei die Veresterung von *N*-Methyltyrosin (**74**) mittels Thionylchlorid und Methanonl in quantitativer Ausbeute verlief. Auch für die Optimierung der Synthese des Dipeptids **122** wurden verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht, wobei Kupplungsreagenzien, Basen sowie Reaktionszeit variiert wurden (Tabelle II-4). Letztendlich konnte durch die Bedingungen aus Eintrag 7 in Tabelle II-4 in akzeptabler Ausbeute das erwartete Dipeptid **122** hergestellt werden. Unglücklicherweise konnten dieses Ergebnis nicht reproduziert werden, so dass erneut Optimierungsversuche gestartet wurden. Dieser zweite Anlauf erwies sich als äußerst lohnend, da die Reaktion mittels HATU und Collidin sowie DMF als Lösungsmittel hervorragende 87 % Ausbeute an **122** lieferte, die zudem reproduzierbar war.



Schema II-23. Synthese der Complestatin-Vorstufe **48**.

Tabelle II-4. Für die Peptidkupplung zwischen **118** und **119** getestete Reaktionsbedingungen.

Eintrag	Kupplungsreagenzien	Base	Bedingungen	Lösungsmittel	Ausbeute
1	DEPBT	NaHCO ₃	0°C, 2 h, RT, 19 h	THF	19%
2	DEPBT	NaHCO ₃	0°C, 2 h, RT, 46 h	THF	11%
3	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 24 h	THF/DMF	92% ^a
4	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 5 h	THF	53%
5	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 71 h	THF/DCM	roh 98%
5-OH					27%
6	EDC, HOAT	NaHCO ₃	0°C, RT, 15 h	DMF	64%/ 18% ^b
7	DEPBT	NaHCO ₃	0°C, 2 h, RT, 20 h	DMF	69%/ 1% ^b
8	DEPBT	NaHCO ₃	0°C, 2 h, RT, 20 h	THF/DMF	37%/ 18% ^b
9	DEPBT	NEt ₃	0°C, 2 h, RT, 20 h	DMF	51%/ 10% ^b
10	HATU	Collidin	0°C, 2 h, RT, 47 h	DMF	87 %

a) Enthält noch Lösungsmittel. b) Ausbeute unerwünschter Diastereomere.

Wichtig zu erwähnen ist, dass alle Peptidkupplungsreaktionen mit polaren Aminosäurebausteinen bevorzugt in dem polaren Lösungsmittel DMF stattfanden. Dies hatte neben guten Ausbeuten auch eine leicht aufwendigere Aufarbeitung, im Vergleich zu Reaktionsansätzen in leicht flüchtigen Lösungsmitteln, zur Folge. Bei Ausführung der Aufarbeitung und Produktisolierung unter Beachtung, dass durch das polare DMF Produkt mit in die wässrige Phase überführt wird, bzw. im Rohrprodukt stets ein Restanteil an DMF enthalten sein kann, stellte dieser Umstand jedoch kein Problem dar.

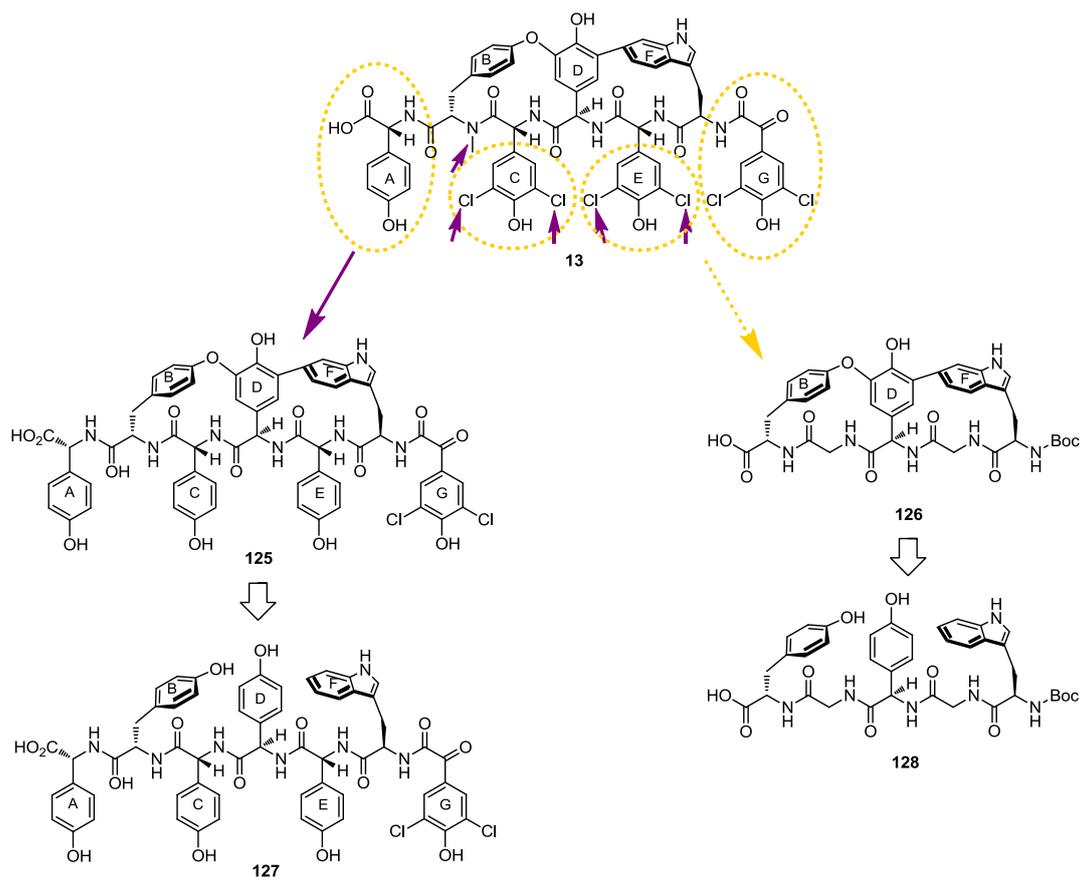
Die quantitative Verseifung des Methylesters **122** mit 0.1 N LiOH(aq) führte zum benötigten Dipeptid **117**. Die Umsetzung des Dipeptids **117** mit **17**, EDC · HCl, HOAT und NaHCO₃ ergab das sowohl am *N*- als auch am *C*-Terminus geschützte Tripeptid **123** in 84 %iger Ausbeute. Die Befreiung des *N*-Terminus von der Boc-Schutzgruppe ergab in quantitativer Ausbeute die linke Seite **114** von Complestatin (**13**). Die abschließende Peptidkupplungsreaktion zeigte sowohl mit EDC · HCl, HOAT und NaHCO₃ in DMF als auch mit COMU, Oxyma und NMM in DMF Umsatz. Im Fall der erst genannten Bedingungen verblieb das Produkt während der Aufarbeitung in der wässrigen Phase und konnte nicht in ein organisches Lösungsmittel überführt werden. Also wurde nach Reaktionsende ohne weitere Aufarbeitung das Lösungsmittel unter vermindertem Druck so weit wie möglich entfernt und der Rückstand über semi-präparative-HPLC gereinigt. Im Gegensatz dazu konnte die Reaktionslösung mit COMU und Oxyma mit Wasser gewaschen werden, ohne Produkt mit in die wässrige Phase zu überführen. Dies trug dazu bei, dass sich der DMF-Anteil erheblich verringerte, was wichtig für die anschließende Isolierung von **124** mittels HPLC war. Obwohl die Reaktionskontrolle über die HPLC eine nahezu vollständige Umwandlung der Edukte **114** und **115** aufwies, betrug die isolierte Ausbeute an **124** lediglich 16 %. Die anschließende Verseifung stellte sich als problematisch heraus. Durch die milde Methode über 0.1 N LiOH(aq) konnte die Estergruppe nicht hydrolysiert werden. Die gewünschte Verseifung konnte auch nicht mit höher konzentriertem LiOH (1N) oder stärkeren Laugen wie NaOH erreicht werden. Für eine enzymatische Entfernung der Methylgruppe wurde Schweineleberesterase ohne Erfolg eingesetzt. Das Problem wurde über eine saure Hydrolyse gelöst. Dabei wurde der Methylester **124** zuerst mit konzentrierter Salzsäure aktiviert und anschließend mit 2.5 N NaOH(aq) behandelt.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein effizienter Zugang zur letzten Vorstufe des Zielmoleküls **13** über eine Syntheseroute mit nur zehn Reaktionsschritten in der längsten linearen Sequenz etabliert. Unter Beachtung der Synthese aller Bausteine ergibt sich eine 23-stufige Synthesestrategie. Dies ist sogar zwei Stufen weniger, als allein die längste lineare Synthesesequenz der von Boger *et. al.* sowie Zhu *et al.* entwickelten Totalsynthesen von Complestatin (**13**).

II.2.2. Peptidsynthese linearer Vorstufen von Complestatin-Derivaten

Aufgrund der pharmakologisch-interessanten Eigenschaften von Complestatin (**13**) wäre es von großem Interesse, die pharmakophoren Strukturelemente der Verbindung durch Struktur-Aktivitäts-Abhängigkeitsstudien zu ermitteln. Von besonderem Interesse wäre z. B. die Rolle der Chlorid-Substituenten sowie der *N*-Methylgruppe. Falls diese Substituenten keinen entscheidenden Einfluss auf die pharmazeutische Aktivität aufweisen, würde das Weglassen dieser Gruppen die Synthese biologisch aktiver Analoga von **13** stark vereinfachen. Dies würde auch unmittelbar zur Verkürzung der Syntheseroute führen, weil z. B. die dreistufige Herstellung des *N*-Methyltyrosins (**74**), welche aufgrund der phenolischen Hydroxygruppe mit nur mäßigen Ausbeuten verbunden ist, wie auch der Chlorierungsschritt der HGP-Bausteine, entfallen würden. Zudem könnte die anfängliche Strategie der SPPS wieder aufgegriffen werden, welche bis zur Abspaltung der fertigen Peptidsequenz Aufarbeitungs- und Isolierungsschritte ersparen würde. Analog zum chemo-enzymatischen Syntheseansatz für die Originalstruktur **13**, besteht auch für die Derivate eine mögliche Syntheseroute darin, die linearen Vorstufen chemisch herzustellen und den Ringschluss biokatalytisch durchzuführen.

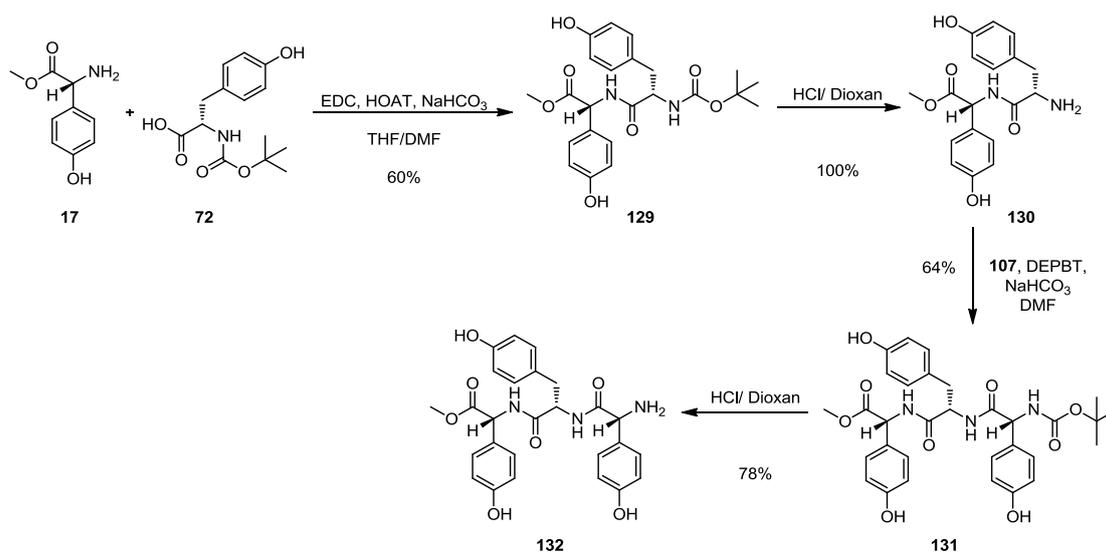
Ein Verzicht auf die Chlorsubstituenten könnte aufschlussreiche Erkenntnisse über die Bedeutung dieser für die Bioaktivität von **13** liefern. Zu diesem Zweck sollte das Complestatin-Derivat **125** synthetisiert werden, wobei für erste Versuche der aromatische G-Ring chloriert bleiben sollte, da der entsprechende Synthesebaustein **16** bereits hergestellt worden war. Eine stark vereinfachte Version von **13** ist das Derivat **126**. Diese Verbindung enthält nur noch die Ringsysteme B, D und F des Complestatins (**13**), welche an der Biarylether- und Biaryl-Bindung beteiligt sind. Die restlichen aromatischen Ringe sind durch die einfachste Aminosäure Glycin ersetzt. Durch Aktivitätsstudien an dem einfachen Complestatin-Derivat **126** könnte die besondere Bedeutung der Biarylether- und Biaryl-Bindungen für die pharmazeutische Wirksamkeit aufgeklärt werden. Falls die einfache Variante **126** tatsächlich ähnliche oder sogar bessere Aktivitäten wie **13** aufweisen würde, könnte durch die kurze chemo-enzymatische Synthesemöglichkeit über die offene Form **128** die Produktion in größerem Maßstab unternommen werden (Schema II-24). Neben der Synthese möglicher neuer Derivate der Complestatin-Familie sollten auf diesem Weg auch eine Reihe strukturell diverser Substrate zur Verfügung gestellt werden, die zur Ermittlung der Substratflexibilität der oxidativen Kupplungsenzyme beitragen können.



Schema II-24. Darstellung von linearen Vorstufen vereinfachter Complestatin-Derivate.

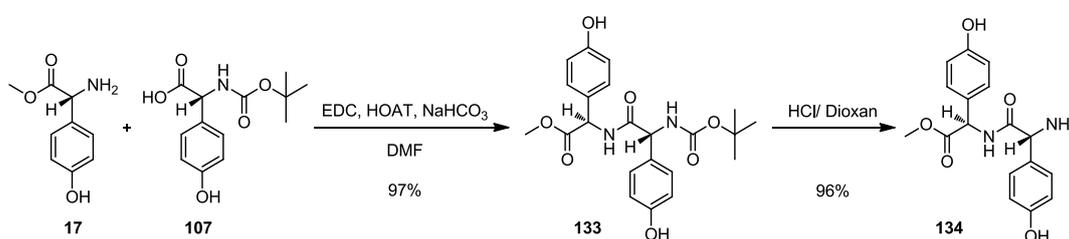
II.2.2.1. Synthese der linearen Vorstufe des Complestatin-Derivats 125

Die Synthese von **127** verlief analog zu der Vorstufen-Synthese von Complestatin (**13**) durch die Kupplung eines Tripeptids **132** (linker Molekülteil) mit dem rechten Tetrapeptid **136**. Die Herstellung des Tripeptids **132** wurde nach der sauren Boc-Entschützung von **131**, welches aus dem Dipeptid **130** durch die Addition von *N*-Boc-D-4-HPG (**107**) entstand, erreicht. Dabei setzte sich die *N*-geschützte Form **129** des Dipeptids **130** aus HPG-Methylester (**17**) und *N*-Boc-L-Tyr (**72**) zusammen (Schema II-25). Die beiden Kupplungsreaktionen erfolgten unoptimiert bereits mit Ausbeuten von 60 bzw. 64 %.



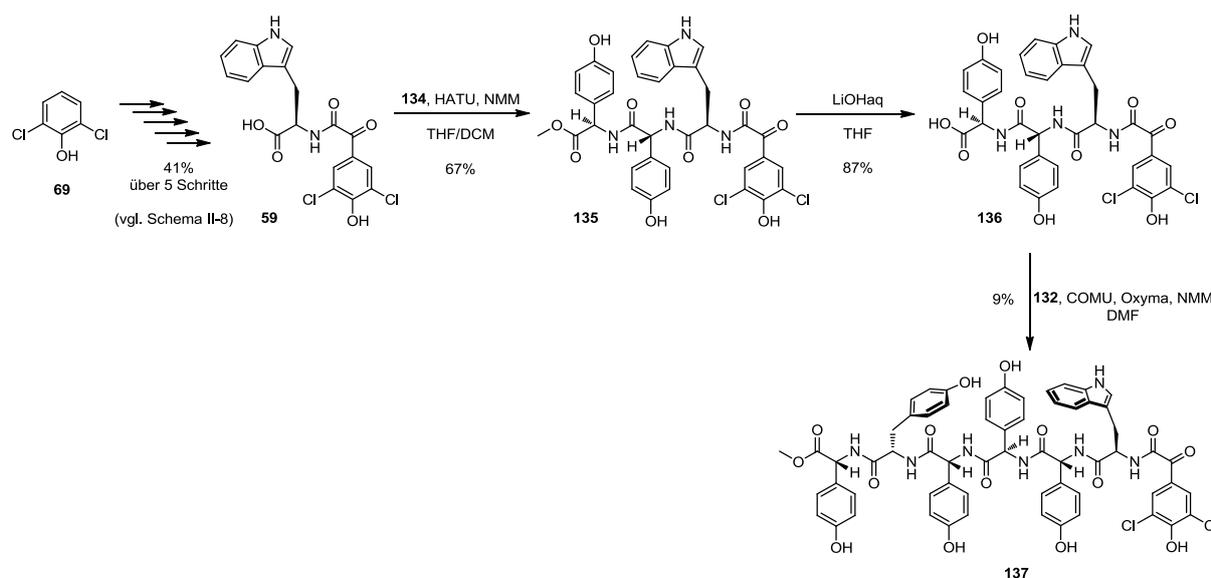
Schema II-25. Synthese des Tripeptids **132**.

Die Kupplung zwischen den beiden HPG-Bausteinen **17** und **107** gelang mit exzellenter 97 % iger Ausbeute. Die Behandlung des Dipeptids **133** mit Salzsäure lieferte das *N*-ungeschützte Molekülfragment **134**, das für die Generierung des rechten Tetrapeptids **136** benötigt wurde (Schema II-26).



Schema II-26. Synthese des Dipeptid-Bausteins **134** zur Herstellung des rechten Tetrapeptids **136**.

Die Synthese des vollständigen Heptapeptids **137** startete mit der Herstellung des Indol-Derivats **59**, das in fünf Stufen mit 2,6-Dichlorphenol (**69**) als Ausgangsstoff erfolgte (s. II.1.1.1). Die anschließende Kupplung mit Dipeptid **134** lieferte das Tetrapeptid **135** in 67 %, welches nach Verseifung des Methylesters die freie Form **136** ergab, welcher mit dem linken Tripeptid **132** verknüpft werden konnte. Diese Bindungsknüpfung resultierte nach einer semi-präparativen HPLC-Aufreinigung in einer Ausbeute von 9 % (Schema II-27).

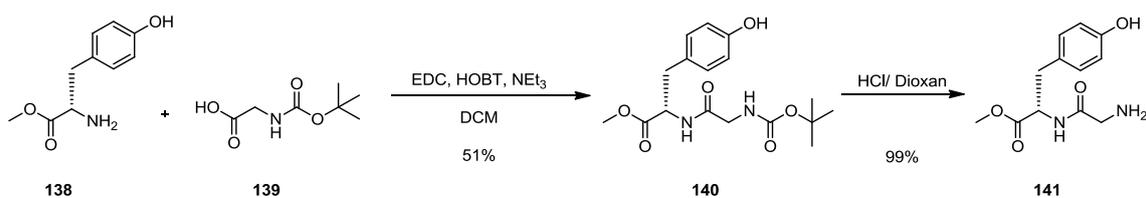


Schema II-27. Synthese der O-geschützten, linearen Vorstufe **137** des Complestatin-Derivats **125**.

Das Resultat dieser Synthesestrategie war eine 8-stufige Synthese in der längsten linearen Sequenz mit einer nicht optimierten Gesamtausbeute von 2 % bis zu Verbindung **137**. Es fehlt noch der letzte Verseifungsschritt, um die gewünschte Vorstufe **127** des Complestatin-Derivats **125** zu erhalten. Die Verseifung des vereinfachten Heptapeptids **137** bereitete wie auch zuvor bei dem Complestatin-Heptapeptid **124** Probleme. Die Hydrolyseversuche durch die Basen LiOH und NaOH scheiterten. Die Strategie über eine Silylierung mittels Trimethylsilylbromid (TMSBr) zu hydrolysieren führte ebenfalls nicht zum erwarteten Ergebnis. Die saure Verseifung, die die Entfernung der Methylgruppe in **124** ermöglichte, ist noch zu testen.

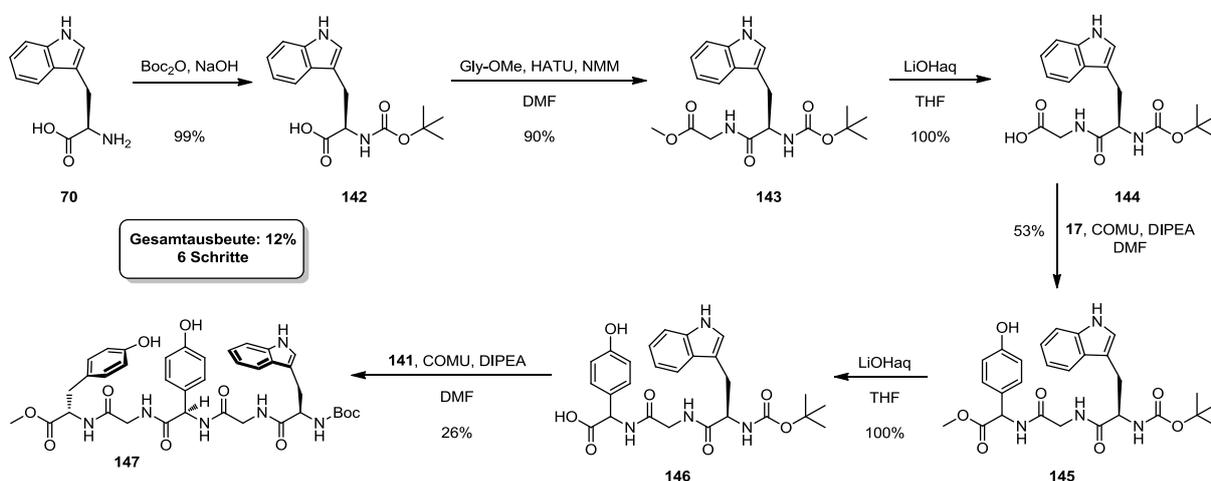
II.2.2.2. Synthese der linearen Vorstufe des Complestatin-Derivats **126**

Das vereinfachte Derivat **126** ist um zwei Aminosäure-Bausteine kürzer als Complestatin (**13**). Die erste Aminosäure HPG und das letzte Glied, die Ketosäure, wurden entfernt, während die zwei aromatischen Aminosäuren C und E jeweils durch Glycin ausgetauscht wurden. Retrosynthetisch wurde das Pentapeptid **128** so zerlegt, dass die Ringe D und F in einer Sequenz erhalten blieben. Dies würde ein potenzielles Substrat für Biarylkupplungsassays liefern (s. Kapitel II.3.2). Somit wurden das Dipeptid **141** (Schema II-28) und Tripeptid **146** (Schema II-29) parallel hergestellt. Die Umsetzung von Tyrosinmethylester (**138**) mit *N*-Boc-Glycin (**139**) erbrachte das Dipeptid **140**, welches durch die Behandlung mit Salzsäure von der Boc-Schutzgruppe befreit wurde und in einer Gesamtausbeute von 50 % **141** ergab (Schema II-28).



Schema II-28. Synthese des Dipeptis **141**.

Für die Synthese des Tripeptids **145** wurde zunächst Glycinmethylester mit *N*-Boc-D-Tryptophan (**142**) verknüpft. Im Gegensatz zu der Kupplungsreaktion zwischen Tyrosinmethylester (**138**) und Boc-Gly (**139**) verlief diese Reaktion mit einer Ausbeute von 90 % sehr gut. Das *O*- und *N*-geschützte Dipeptid **143** wurde in quantitativer Ausbeute am C-Terminus von der Schutzgruppe befreit und die erhaltene Verbindung **144** mit HPG-OMe (**17**) gekuppelt. Das dabei mit 53 % iger Ausbeute entstandene Tripeptid **145** wurde mit Hilfe von LiOH(aq) quantitativ verseift und mit dem Dipeptid **141** zum Pentapeptid-Methylester **147** in sechs Schritten der längsten linearen Synthesesequenz und in einer Gesamtausbeute von 12 % umgesetzt (Schema II-29). Zu den Kupplungsreaktionen zwischen den längeren Peptidketten ist zu bemerken, dass diese mit COMU als Kupplungsreagenz am besten funktionierten. Eine saure Verseifung zum gewünschten Produkt **128** konnte lediglich testweise durchgeführt werden, wobei HPLC- sowie MS-Analysen eine quantitative Umsetzung des Edukts **147** zeigten.

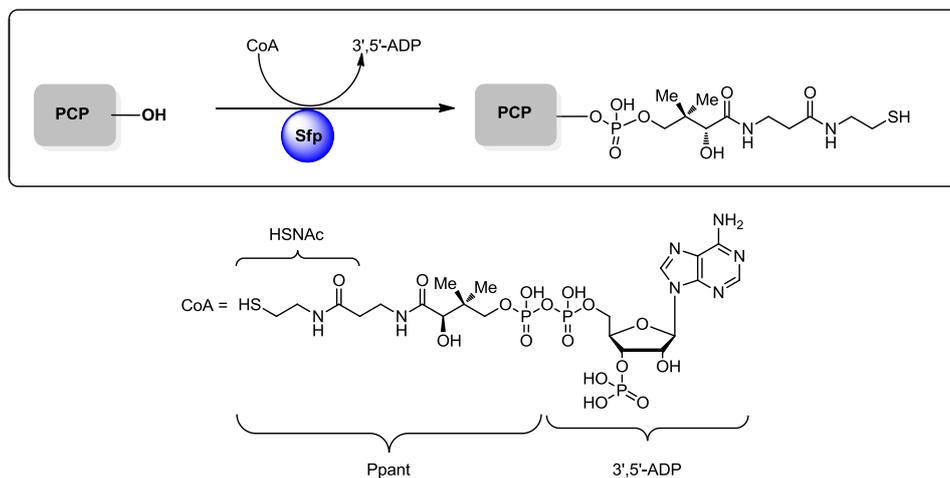


Schema II-29. Synthese der linearen Vorstufe des Complestatin-Derivats **126**.

Insgesamt gelang, zusätzlich zu der linearen Vorstufe **48** von Complestatin (**13**), die Darstellung von zwei weiteren azyklischen Peptidketten-Vorläufern (**137**, **128**) von vereinfachten Complestatin-Derivaten in sehr kurzen Syntheserouten der LPPS aus nur acht bzw. sechs Reaktionsschritten der längsten linearen Synthesesequenz, wobei einzelne Reaktionsschritte noch nicht optimiert sind.

II.3. Enzymatische Kupplungsreaktionen

Der letzte Schritt für die chemo-enzymatische Totalsynthese von Complestatin (**13**) aus der linearen Vorstufe **48** ist die enzymatische Biaryl- und Biaryletherkupplung durch die vermuteten Katalysatoren ComI und ComJ. Der Erfolg von enzymatischen Reaktionen hängt von vielen Faktoren ab. Beispiele sind die Art des gewählten Puffers und dessen pH-Wert, die eingesetzten Konzentrationen des Substrates sowie der Enzyme und Co-Faktoren oder die Reaktionstemperatur. Wie bei vielen anderen Enzymen ist auch für oxidative CYP450-Enzyme die Struktur des umzusetzenden Substrats wichtig.^{84,101} Die Enzyme müssen in der Lage sein, das dargebotene Substrat zu erkennen und oxidativ zu zyklisieren. *In vitro* Untersuchungen für andere Naturstoffe aus der Klasse der BEPs des Vancomycin-Typs lassen vermuten, dass das Substrat während der oxidativen Bildung der Biaryl- und Biarylether-Bindungen noch an eine PCP-Domäne gebunden ist.²⁰ Das bedeutet, dass vermutlich auch in *S. lavendulae*, dem Produzenten von **13**, die lineare Vorstufe **48** noch an eine PCP-Domäne gebunden sein muss, um von Seiten der Kupplungsenzyme als Substrat erkannt zu werden. An PCP-Domänen ist eine prosthetische Gruppe, ein Phosphopantetheinyl (Ppant)-Arm, kovalent an einen konservierten Serin-Rest gebunden, die posttranslational aus Coenzym A (CoA) übertragen wird. Dabei fungieren Ppant-Transferasen, wie das Sfp aus *Bacillus subtilis*, als Überträger des Ppant-Restes (Schema II-30).¹⁰² Das Substrat ist wiederum kovalent an die Thiol-Funktion des Ppant-Arms gebunden.

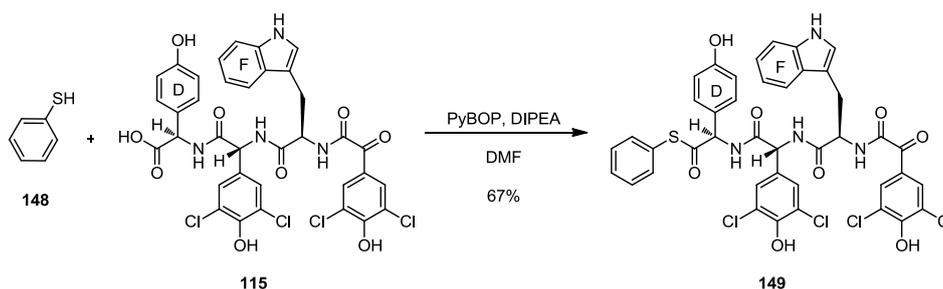


Schema II-30. Prinzip der Ppant-Übertragung durch Sfp.¹⁰²

In dieser Arbeit sollten zum einen enzymatische Kupplungsassays durchgeführt werden, in denen die Substrate an PCP-Domänen aus der Biosynthese von Complestatin (**13**) gebunden sein sollten. Zum anderen sollte aufgeklärt werden, ob die Bindung der linearen Peptidketten an PCP-Domänen essentiell ist. Hierfür sollte die PCP-Domäne durch vereinfachte PCP-Mimetika, wie CoA oder *N*-Acetylcysteamin (HSNAc), ersetzt werden.

II.3.1. PCP-Beladungsexperimente

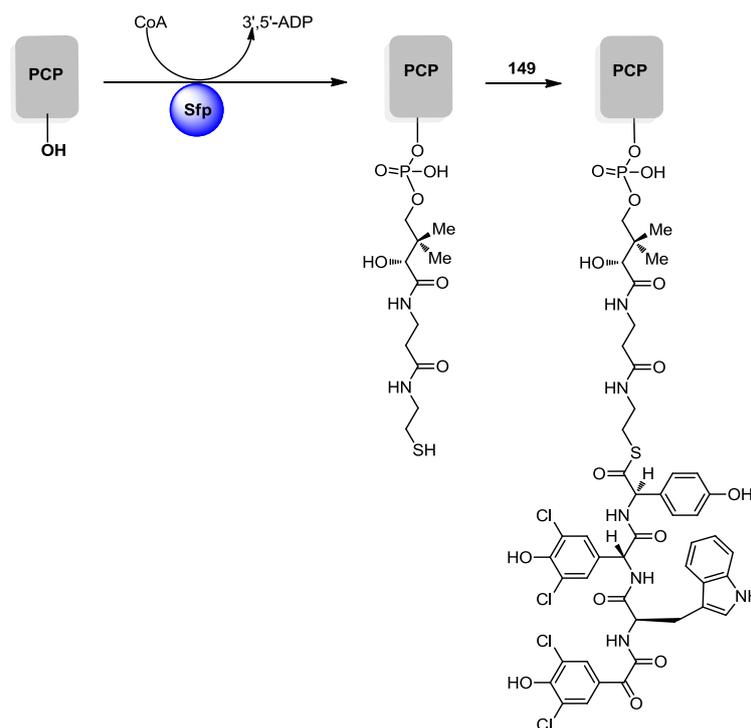
Aktuell liegen keine Erkenntnisse über das Substrat der Kupplungsenzyme ComI und ComJ vor. Es ist also auch nicht bekannt, ob die Enzyme in der Biosynthese erst nach dem Aufbau der kompletten Peptidkette zum Einsatz kommen. Denn theoretisch ist es auch möglich, dass die D- und F-Ringsysteme bereits während der Peptidkettenverlängerung oxidativ verknüpft werden. Um hier erste Einblicke zu erhalten, und auch weil das Tetrapeptid **115** schneller und in größeren Mengen zugänglich war, wurde für erste biokatalytische Reaktionen **115** verwendet. Hierzu wurde **115** zunächst durch Thioesterbildung mit Thiophenol aktiviert (Schema II-31).



Schema II-31. Aktivierung des Tetrapeptids **115** durch Thioesterbildung.

Die Aktivierung des Tetrapeptids **115** zum Phenylthioester **149** erbrachte das erwartete Ergebnis nur unter Schutzgas-Bedingungen, da unter dem Einfluss der eingesetzten Base DIPEA Thiophenol (**148**) bei Luftkontakt durch Oxidation sehr schnell zum Disulfid dimerisierte. Die Reaktion unter Argon-Atmosphäre lieferte jedoch das aktivierte Tetrapeptid **149** in einer Ausbeute von 67 %.

Für die Übertragung des Tetrapeptids auf die entsprechende PCP-Domäne (erste PCP-Domäne der NRPS-Untereinheit ComC, vorhergesagt mittels der Software ‚PKS/NRPS-Analysis‘, plus 12 Aminosäuren am N-Terminus und 3 Aminosäuren am C-Terminus = ComC-1st-PCP+15AA)¹⁰³ sollte die aktive Thioform **149** durch Versetzung mit CoA in ein mögliches Substrat für Sfp überführt werden. Unglücklicherweise konnte keine CoA-Übertragung nachgewiesen werden, obwohl Literaturbekannte Vorschriften für längere Peptidketten⁸⁴ sowie eine Reihe eigener Optimierungsversuche durchgeführt wurden. Auch die direkte Umsetzung von **115** mit CoA über eine für chemische CoA-Übertragung bewährte Methode, allerdings für einzelne Aminosäuren,¹⁰⁴ führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Somit wurde beschlossen, zuerst die PCP-Domäne ComC-1st-PCP+15AA, welche während der Biosynthese das Tetrapeptid trägt, mittels CoA und Sfp zu aktivieren (Ppant-Übertragung). Durch anschließende Zugabe von **149** sollte durch Umesterung das aktivierte Tetrapeptid **149** auf den Ppant-Rest der PCP-Domäne übertragen werden (Schema II-32).



Schema II-32. Schematische Darstellung einer PCP-Beladung mit Ppant und anschließend **149**.

Vor der eigentlichen Beladung mit Molekül **149**, wurden die Assaybedingungen anhand des in nur einem Schritt herstellbaren *S*-Phenylthioacetats optimiert. Dabei wurde eine Temperatur von 37 °C für die Beladung von ComC-1st-PCP+15AA mit dem Ppant-Rest in einem 50 mM Tris/HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7.5 und einer Reaktionszeit von 1 h erarbeitet. Sfp und die hierfür notwendige PCP wurden von Herrn René Richarz aus unserer Arbeitsgruppe überproduziert und aufgereinigt. Für die nächste Stufe, der Substrat-Ladung, sollte *S*-Phenylthioacetat in dem selben Puffer gelöst werden. Es bildete sich jedoch eine Emulsion, was auch durch Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) nicht zu verhindern war. Dennoch wurde die Emulsion zum Reaktionsansatz mit der aktivierten PCP gegeben und 1 h bei 28 °C inkubiert. Die beiden Schritte der Beladung, sowie das unbehandelte PCP, wurden mittels LC-MS analysiert. Hierbei wurden die Ionenpeaks der mehrfach geladenen PCPs detektiert, da die molare Masse (*M*) der PCP, sowie der erwünschten Derivate wie, die PCP-Ppant-Acetat-Verbindung (*M*= 11503.87 g/mol), für eine direkte Detektion des einfach geladenen Moleküls zu groß ist.

Die LC-MS-Daten zeigten deutlich die erwarteten Ionenpeaks und damit den Erfolg dieser PCP-Ladungsversuche. Aus Abbildung II-8 sind die Daten zu den Massenspektren ComC-1st-PCP+15AA (A), von dem ersten (B) und zweitem Schritt (C) des PCP-Lade-Assays zu entnehmen.

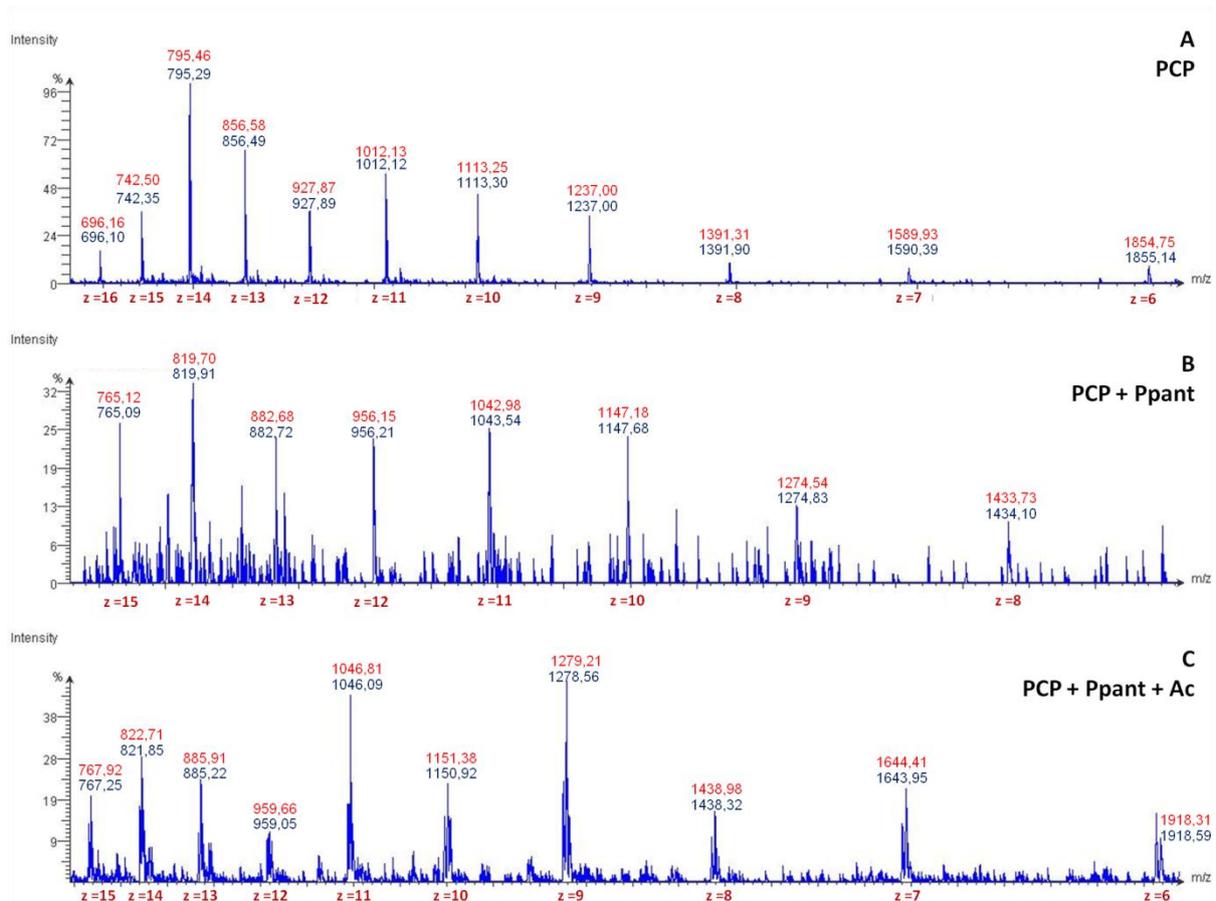


Abbildung II-8. Massenspektren von A) ComC-1st-PCP+15AA, $M = 11122.48$ g/mol; B) PCP-Ppant, $M = 11461.87$ g/mol; C) PCP-Ppant-Acetat, $M = 11503.87$ g/mol. Die detektierten Ionenpeaks entsprechen m/z von mehrfach positiv geladenen ($z > 1$) Molekülen. Blaue Werte = gemessene Daten; rote Werte = berechnete Daten.

Nach dem positiven Ergebnis des Test-PCP-Lade-Assays mit *S*-Phenylacetat sollten PCP-Beladungsversuche mit dem potenziellen Substrat für die Biarylkupplungsassays unter den Bedingungen des Test-Lade-Assays unternommen werden. Jedoch war **149** nicht löslich im verwendeten Tris/HCl-Puffer. Dies konnte allerdings durch Zugabe von DMSO erreicht werden. Die Substrat-Stocklösung durfte so viel DMSO enthalten, dass die Endkonzentration von DMSO in der Reaktionslösung 5 % v/v betragen würde. Doch als die Substratlösung zum Assayansatz gegeben wurde, fiel ein starker Niederschlag aus. Eine HPLC-Analyse ließ darauf schließen, dass es sich bei dem Niederschlag um das Substrat **149** handelte. Die HPLC-MS-Messungen zu den Assays zeigten keine Hinweise auf eine erfolgreiche Beladung. Ein offensichtlicher Grund schien die schlechte Löslichkeit von **149** zu sein. Ein höherer Anteil von Lösungsmitteln wie DMSO kann zum Aktivitätsverlust der verwendeten Proteine führen. Dennoch wurden Stabilitätsversuche mit PCP und Acetonitril (ACN) bzw. DMF, zwei weitere Lösungsmittel in denen sich **149** gut löst, durchgeführt. Sollte die Struktur des PCPs nicht beeinträchtigt werden, könnten diese Lösungsmittel als Kosolvens für die Beladungs-Assays Verwendung finden. Dazu wurde das PCP in der Endkonzentration des

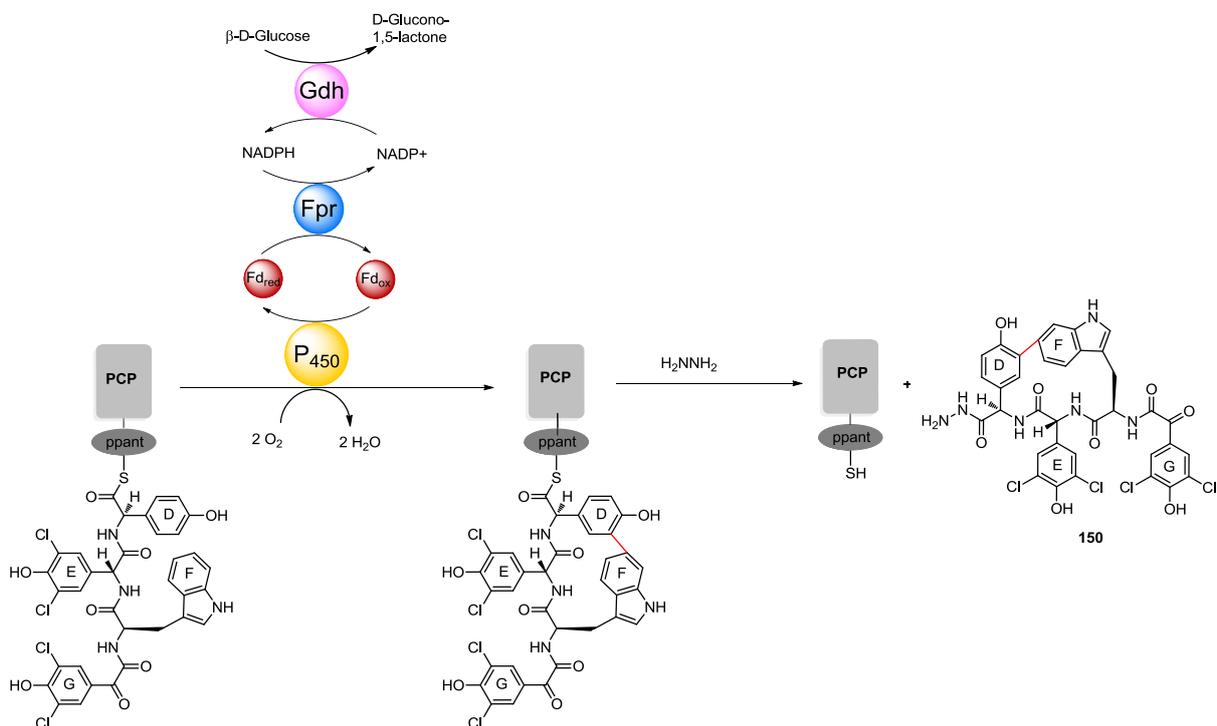
Assays in einem 1:1-Gemisch aus Kaliumphosphatpuffer (KPP) und organischem Lösungsmittel gelöst und unter Assaybedingungen (30 °C, 1h) inkubiert. Weder in den HPLC- noch in den MS-Daten waren Veränderungen im Vergleich zu der Probe des PCPs in reinem Puffer zu beobachten. Mit der neuen Erkenntnis, dass die verwendete PCP-Domäne in Lösungen mit 50 % Acetonitril bzw. DMF stabil zu sein schien, wurde entschieden, die PCP-Beladung in 50 % Acetonitril / 50% KPP durchzuführen. Die Entscheidung fiel auf ACN, da ein Assay-Versuch (30 °C, 1h) mit DMF wegen einer scheinbaren Zersetzung von **149** in 50 % DMF / 50% KPP scheiterte. Der Puffer wurde von Tris/HCl auf KPP (50 mM, pH 7.5) gewechselt, weil sich während der Optimierungsversuche für die Beladung des PCP mit **149** herausstellte, dass Sfp im Gegensatz zum Test-Assay mit S-Phenylthioacetat in Tris/HCl ausfiel. Somit wurde für die Beladung der PCP-Domäne mit dem Tetrapeptid zunächst das PCP mittels CoA und Sfp aktiviert (KPP, 37 °C, 1 h). Anschließend wurde das zu ladende Tetrapeptid in der aktivierten Form **149** gelöst in ACN zugegeben (50 % v/v Endkonzentration ACN) und bei 28 °C für 1 bis 2 h inkubiert. Die LC-MS-Daten zeigten auch hier eine erfolgreiche Beladung der PCP, wobei noch ein hoher Anteil an nicht-reagiertem **149** zu sehen war.

II.3.2. Enzymatische Biaryl-Kupplungsexperimente

Die oxidative Biaryl-Kupplung mit Hilfe der Cytochrom-P450-Enzyme ComI und ComJ (bereitgestellt von Herrn René Richarz) wurde direkt im Anschluss an die Herstellung des PCP-Tetrapeptids durchgeführt, ohne dass eine weitere Aufreinigung des Enzymkomplexes stattfand. Es wurde lediglich der Versuch unternommen, überschüssiges **149** durch Extraktion mit ACN aus dem Assay-Gemisch zu entfernen. Um das Assay-Gemisch anschließend vom restlichen ACN zu befreien wurde es einem leichten Argon-Strom ausgesetzt.

Nachdem die Mischung aus dem PCP-gebundenen Substrat und überschüssigem PCP, Sfp und CoA mit KPP auf das benötigte Volumen aufgefüllt wurde, wurden die Oxidasen ComI bzw. ComJ, von denen vermutet wird, dass sie für die Biaryl-Kupplung verantwortlich sind, zugegeben. Auch ein in unserer Arbeitsgruppe standardmäßig genutztes Elektronendonator-System aus den Proteinen PetF, FprDH5 α , GdhBM3, sowie Glucose und NADPH wurde eingesetzt. Bei Fpr handelt es sich um eine NADPH-Ferredoxin-Oxidoreduktase, die Elektronen von NADPH auf das Spinat-Ferredoxin PetF überträgt.⁸⁴ Die CYP450-Enzyme können dann die Elektronen von PetF nutzen, um unter Reduktion von O₂ zu H₂O die Bindung zwischen dem D- und F-Ring des Tetrapeptids zu knüpfen. Die Glucosedehydrogenase Gdh und Glucose dienen dabei zur Regeneration des NADPH⁸⁴ (Schema II-33). Die biokatalytische Biaryl-Kupplung erfolgte für 1 h bei 30 °C. Dem folgend wurde der Mischung Hydrazin zugesetzt, um das Tetrapeptid von der PCP-Domäne zu trennen und das freie Cyclopeptid

150 zu erhalten.⁸⁴ Dieser Schritt sollte lediglich analytischen Zwecken dienen. Durch die neu entstehende Bindung unterscheidet sich nämlich die Masse des zyklischen Tetrapeptids nur um die Masse von zwei Protonen von der des linearen Tetrapeptids. Da in der MS wegen eines zu großen m/z des PCPs nur die Ionenpeaks von mehrfach geladenen Teilchen detektierbar waren, könnte man diese geringe Massendifferenz nicht eindeutig detektieren. So ist z. B. für $z = 10$ für das lineare an ComC-1st-PCP+15AA gebundene Tetrapeptid mit $M = 12229.88$ g/mol einen Ionenpeak bei $m/z = 1223.99$ zu erwarten. Das entsprechende m/z für das zyklische, PCP-gebundene Tetrapeptid liegt bei 1223.79. Aus diesem Grund schien das Abspalten des Cyclopeptids von der PCP-Domäne über eine irreversible Substitution durch Hydrazin sinnvoll.



Schema II-33. Schematische Darstellung der enzymatischen Biaryl-Kupplungsreaktion. Erläuterung der einzelnen Reaktionsschritte, siehe Text.

Durch die endständige Hydrazingruppe erhöht sich die Polarität von **150** im Vergleich zu **115**. Dadurch sollte die Differenz der Retentionszeit von durchgehend ungebundenem **115** im Vergleich zu den entsprechenden PCP-Spaltprodukten im HPLC-Chromatogramm signifikant größer sein. Dies stellt prinzipiell einen weiteren Vorteil der Hydrazin-Abspaltung dar. Die höhere Polarität erschwerte jedoch erheblich die Aufreinigung der Assaylösung. Eine Filtration durch Zentrifugation über Zentrifugal-Filter der Fa. VWR sollte eigentlich die Assaylösung von Proteinresten befreien. Nach der Abspaltungsreaktion wurde versucht mittels Festphasenextraktion **150** aus der Assaymischung zu isolieren. Durch seine hohe Polarität eluiert **150** die Reversed-Phase-Festphasen-Säule jedoch sehr schnell und damit ähnlich wie die noch immer in der Assaylösung enthaltenen Proteinreste. Die

gesammelten Fraktionen waren daher nach der Aufreinigung noch immer stark verunreinigt, unter anderem mit Proteinen. Die Signale der Proteine schienen in der LC-MS-Analyse alle anderen Analyten zu überdecken. Aus diesem Grund konnte bisher keine tatkräftige Aussage über den Erfolg oder Misserfolg dieser biokatalytischen Kupplungsreaktionen gemacht werden. Die eigentlich bewährte Reinigungsmethode der Festphasenextraktion ist hier noch zu optimieren.⁸⁴ Ein geeigneter Eluentengradient ist zu erarbeiten. Da sich jedes Molekül auf der Festphasen-Säule anderes verhält, kann der passende Eluentengradient lediglich durch aufwendiges Erproben ermittelt werden. Zudem könnten andere Methoden für die Spaltung der Produkt-PCP-Bindung getestet werden. Beispielsweise könnten weniger polare Hydrazin-Derivate, wie Benzylhydrazin oder Methylhydrazin,¹⁰¹ eingesetzt werden, um größere HPLC-Retentionszeiten zu erhalten. Alternativ wäre prinzipiell eine enzymatische Hydrolyse, z. B. mittels einer Thioesterase, möglich. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Optimierungsmöglichkeiten im Verlauf dieser Arbeit nicht mehr getestet werden.

II.4. Untersuchungen zur Halogenierung in der Complestatin-Biosynthese

In der Biosynthese des Complestatins (**13**) ist vermutlich ein einziges Enzym, die Halogenase ComH, für die Einführung aller sechs Chloratome verantwortlich. Zurzeit ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der Biosynthese die Chlorierungen stattfinden. Wir nehmen an, dass bereits die während der Peptidkettenverlängerung eingebauten Bausteine chlor-substituiert sind. Der Grund hierfür ist, dass es sich bei zwei der drei betroffenen Bausteine um die Aminosäure HPG (**47**) handelt, während der dritte Baustein eine Ketosäure **46** darstellt, aus welcher **47** gebildet wird (vgl. Kapitel I.4, Abbildung I-7). Daher liegt die Vermutung nahe, dass ComH eine der Zwischenstufen (**43** bis **47**) aus der Biosynthese des L-4-HPG (L-**47**) halogeniert (Abbildung II-9). Insbesondere **46** scheint ein sinnvolles Molekül für die Chlorierung durch ComH zu sein, da die so gebildete chlorierte Ketosäure **16** anschließend nur noch zur chlorierten Aminosäure **23** transaminiert werden müsste (Abbildung II-9). Im Rahmen dieser Arbeit sollten Halogenierungsversuche mit ComH unternommen werden, um dessen Substratspektrum zu ermitteln. Hierzu sollten alle in der Biosynthese von HPG (**47**) vorkommenden Zwischenstufen und **47** selbst in Halogenierungsassays als Substrate für ComH getestet werden.

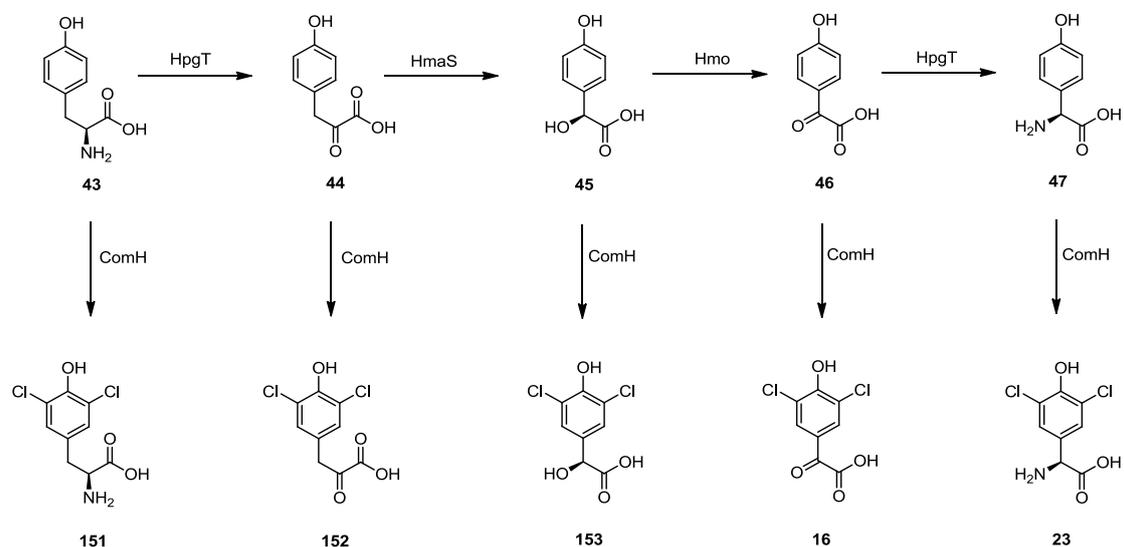


Abbildung II-9. Potenzielle Substrate für ComH und die mutmaßlichen Chlorierungsprodukte. HpgT = *p*-HPG Aminotransferase; HmaS = *p*-Hydroxymandelsäure Synthase; Hmo = *p*-Hydroxymandelsäure Oxidase

Als weitere Substrate für die Halogenierungsexperimente sollten die SNAc-Derivate (**154** - **158**) von **43** bis **47** als aktivierte Varianten der entsprechenden Carboxyl-Verbindungen dienen, welche als vereinfachte Mimetika der PCP-gebundenen Moleküle fungieren würden (Abbildung II-10).

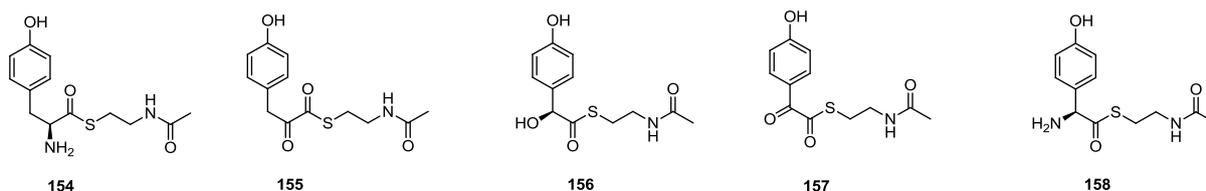
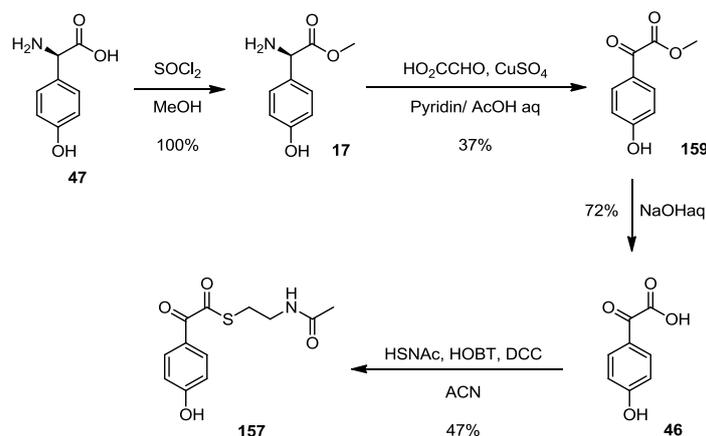


Abbildung II-10. SNAc-Derivate der potenziellen Chlorierungssubstrate.

II.4.1. Synthese der potenziellen Substrate und Produkte

Unter den Substrat-Kandidaten war (4-Hydroxy-)2-oxoessigsäure (**46**) der einzige, der nicht käuflich zu erhalten war. Die Verbindung konnte aus D-4-HPG (**47**) über den Methylester **17** hergestellt werden. Die Cu(II)-vermittelte Transaminierung zwischen **17** und Glyoxylsäure wurde in einem wässrigen Puffer mit Pyridin und Essigsäure durchgeführt und erbrachte in 37 % iger Ausbeute **159**. Der entstandene Methylester **159** wurde in einer Ausbeute von 72 % zu der gewünschten Ketosäure **46** verseift (Schema II-34).

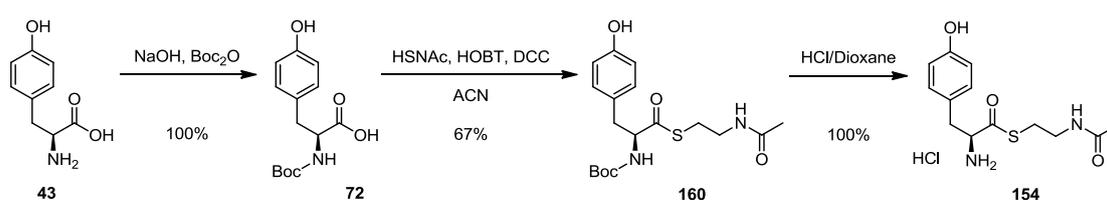


Schema II-34. Syntheseweg zur Ketosäure **46** und dessen Umsetzung in den aktiven Thioester **157**.

Für die Aktivierung von **46** in Form des Thiosters **157** wurden mehrere Bedingungen getestet. Laut HPLC-Untersuchungen des Reaktionsfortgangs schien die Generierung erfolgreich. Nach der Aufarbeitung und Isolierung sowohl mittels Säulenchromatographie als auch durch „Medium Pressure Liquid Chromatography“ (MPLC) deutete das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur auf einen sehr geringen Anteil der erwarteten Verbindung hin. Stattdessen waren die Edukte **46** und HSNac deutlich zu erkennen. Die Ergebnisse der NMR-Analyse in Kombination mit denen der HPLC-Reaktionskontrolle ließen darauf schließen, dass sich **157** während der Aufarbeitungs- und Isolierungsbemühungen zersetzte. Um eine Zersetzung zu verhindern, wurde die Produktisolierung ohne eine vorherige wässrige Aufarbeitung durchgeführt. Die direkte Säulenchromatographie sowie die Reinigung mit

Hilfe der MPLC reichten nicht die Zersetzung von **157** zu umgehen. Schließlich konnte der gewünschte Thioester **157** mit HOBT und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagenzien in ACN gebildet und nach Abzentrifugation des dabei entstandenen DCC-Harnstoff-Salzes säulenchromatographisch mit einem Eluenten aus 5 % MeOH in DCM in akzeptablen 47 % Ausbeute isoliert werden.

Weitere Umwandlungsversuche der Carbonsäure-Form in den Aktivthioester wurden mit Tyrosin (**43**), 3-(4-Hydroxyphenyl)-2-oxopropansäure (HPPA) (**44**) und DL-4-Hydroxymandelsäure (HMA) (**45**) unternommen. Im Fall von DL-HMA (**45**) ergab sich das gleiche Zersetzungsproblem bei den Aufarbeitungs- und Isolierungsversuchen wie bei **157**. Hierbei war die Isolierung jedoch nicht reproduzierbar und muss noch optimiert werden. Die Kupplungsexperimente von HSNac an HPPA (**44**) erbrachten nicht das erwartete **155**. Aus Kostengründen sollten erst wieder Versuche unternommen werden, wenn **44** selbst und auch die übrigen möglichen Substrate bei den Halogenierungsassays nicht zum gewünschten Ziel führten. Die Wahrscheinlichkeit für HPG (**47**) tatsächlich das Chlorierungssubstrat zu sein, wurde als äußerst gering eingeschätzt, da in diesem Fall in der Biosynthese ein überflüssiger Schritt zurück zur Dichlor-Ketosäure **16** stattfinden müsste. Deshalb wurde die Herstellung des SNAc-Derivats zurückgestellt. Die Synthese des SNAc-Tyrosins **154** konnte nur durch die vorherige Schützung der Aminogruppe des Tyrosins und daher über die Zwischenstufe **160** erreicht werden (Schema II-35). Nach der quantitativen Einführung der *N*-Boc-Schutzgruppe wurde der Thioester **160** mit Hilfe der Kupplungsreagenzien HOBT und DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) in 67 % Ausbeute gebildet. Im Anschluss wurde die *N*-Boc-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen in quantitativer Ausbeute entfernt.

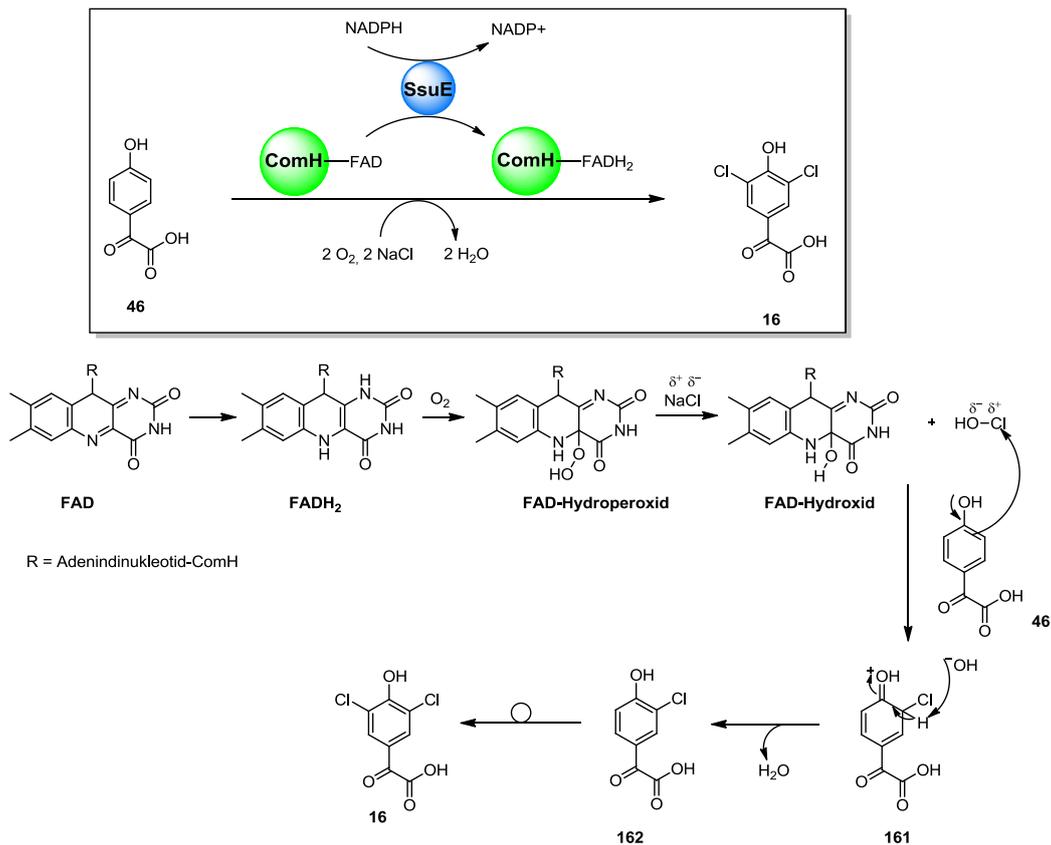


Schema II-35. Synthese von SNAc-Tyrosin **154**.

Die Halogenierungsassays wurden aufgrund der Verfügbarkeit von nur geringen Mengen ComH (s. Kapitel II.4.3) mit sehr geringen Substanzmengen durchgeführt, die nur eine HPLC- und MS-Analyse möglich machten. Hierzu sollten als Referenz die bereits chemisch chlorierten Verbindungen dienen. Als Synthesemöglichkeit wurde für die Chlorierung von **43**, **44** sowie **45** die in Kapitel 3.1.1. für die Herstellung von **23** beschriebene Strategie mit Sulfurylchlorid als Chlorierungs- und Sulfolan als Lösungsmittel gewählt. Jedoch fand die Bischlorierung nur im Fall von Tyrosin (**43**) in 76 % Ausbeute statt. Die Herstellung der Dichlor-Ketosäure **16** wurde bereits in Kapitel 3.1.1. erläutert.

II.4.2. Flavin-abhängige Halogenasen

Ein nicht unerheblicher Teil von Enzymen innerhalb der Familie der Halogenasen ist Flavin-abhängig. Diese Halogenasen interagieren mit FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) spezifisch über eine entsprechende Bindungsstelle des Proteins. Dieses ist in seiner reduzierten Form (FADH₂) für die Halogenierungsreaktion essentiell.¹⁰⁵ Hierbei wird vermutlich durch molekularen Sauerstoff FADH₂ in die FAD-Hydroperoxid Form überführt. Die Hydroperoxid-Gruppe wird dann durch den Einfluss eines Chlorid-Ions in hypochlorige Säure und FAD-Hydroxid zersetzt, wobei eine Umpolung am Chloratom stattfindet.¹⁰⁶ Während FAD-OH spontan in Wasser und FAD zerfällt,⁸¹ wird die hypochlorige Säure nukleophil vom Halogenierungssubstrat angegriffen, wobei es sich bei dem Substrat meist um ein elektronenreiches Gerüst wie Indole, Pyrrole oder Phenole, handelt. Ein Reaktionsschema und der postulierte Mechanismus sind in Schema II-36 am Beispiel eines potenziellen Chlorierungskandidaten für ComH, der Ketosäure **46**, dargestellt. Eine Flavin-abhängige Halogenase wird in der Regel von einer Flavin-Reduktase unterstützt, die unter Verbrauch von NAD(P)H (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)) FADH₂ aus FAD regeneriert.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Dabei besteht keine spezifische Abhängigkeit der Halogenase zu einer bestimmten Flavin-Reduktase.⁸¹ Häufige Verwendung findet die Flavin-Reduktase SsuE aus *E. coli*,¹¹⁰ welche bevorzugt FMN (Flavin-Mononukleotid) umsetzt, aber auch in der Lage ist, FAD zu reduzieren.¹⁰⁸



Schema II-376. Reaktionsschema und der putative Mechanismus der Chlorierung eines Aromaten am Beispiel der Ketosäure **46** durch die Flavin-abhängige Halogenase ComH.

II.4.3. Aktivitätstest zu ComH und SsuE

Für die Halogenierungsassays wurden die Flavin-abhängige Halogenase ComH aus dem Complestatin-Produzenten *S. lavendulae* sowie die Flavin-Reduktase SsuE überproduziert und aufgereinigt. SsuE findet Verwendung, da das Complestatin-Gencluster selbst keine Flavin-Reduktase kodiert, und gezeigt wurde, dass SsuE in der Lage ist, eine große Bandbreite Flavin-abhängige Halogenasen zu reduzieren.¹⁰⁵ Die Klonierung der kodierenden Gene *comH* und *ssuE* in die Expressionsvektoren pGS-21a und pHIS-8 erfolgten im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Anna von der Linden.¹¹¹ Bei der Optimierung der Proteinproduktion stellte sich heraus, dass sich ComH exklusiv mit frisch transformierten Zellen überproduzieren ließ. Kultivierte und länger gelagerte Zellen produzierten kein ComH. Ferner erwies sich eine Inkubation über Nacht bei 16 °C, 200 rpm als am besten geeignet (Abbildung II-11). Dabei war für ComH eine Induktion durch 1 mM IPTG nötig, während im Fall von SsuE 0.2 mM IPTG ausreichend war. Beide Expressionen lieferten lösliches Protein in ausreichenden Mengen (Abbildung II-11). Zwar waren im Fall von ComH Verunreinigungen vorhanden, welche zum Teil auf eine mögliche Zersetzung (z. B. Abspaltung des ca. 27 kDa großen GST-Tags bei Expression mit pGS-21a) während der Vorbereitung der Proben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

(1x Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Ladepuffer; 5 min, 95 °C) zurückzuführen sind. Es konnten aber sowohl ComH als auch SsuE in ausreichender Reinheit für erste Enzymassays erhalten werden.

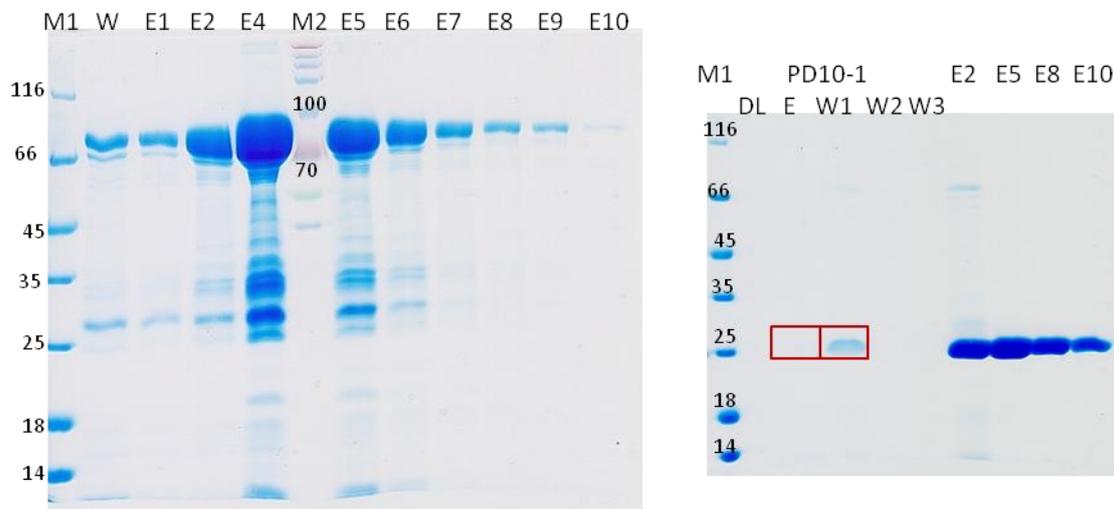


Abbildung II-11. SDS-PAGE der Aufreinigung von ComH (84.2 kDa; links) und SsuE (23.56 kDa; rechts). M1 = Unstained Protein Molecular Weight Marker der Fa. *Thermo Scientific*; M2 = peqGOLD Protein Marker VII (Spectra HR) der Fa. *Peqlab*; W = Wasch-Durchlauf der Ni-NTA-Säule; E1-10 = Eluate 1-10 Ni-NTA-Säule; PD10-1, DL = Durchlauf der PD10-Säule der 1. Elution; PD10-1, E = Elution des entsalzten Proteins von der PD10-Säule; PD10-1, W1-3 = Wasch-Durchläufe 1-3 der PD10-Säule.

Im Fall von SsuE traten trotz guter Löslichkeit bei der Aufreinigung mehrere Probleme auf. Zum einen musste mehr Ni-NTA-Agarose benutzt (2 mL an Stelle von standardmäßig 1 mL pro 1 L angesetzter Kultur) und die Inkubationszeit der Proteinlösung mit dem Ni-Harz von 1 h auf 2 bis 3 h erhöht werden, da sonst zu viel SsuE nicht gebunden wurde und während der Aufreinigung verloren ging. Zum anderen zeigte sich, dass das übliche Eluieren mit 2.5 mL einer 250 mM Imidazol-Lösung nicht ausreichend war, um SsuE wieder von dem Ni-Harz zu lösen. Stattdessen musste eine 500 mM Imidazol-Lösung benutzt und die Elution drei Mal mit 2.5 mL sowie einer Inkubationszeit des Ni-Harzes im Elutionspuffer von insgesamt 90 min durchgeführt werden. Der Grund für das zunächst erschwerte Binden des SsuE an das Ni-Harz könnte an der Position des His-Tags liegen. SsuE besitzt einen *N*-terminalen Tag, der evtl. aufgrund der kompakten Faltung des Proteins nicht leicht zugänglich ist. Hat jedoch eine Bindung an das Ni-Harz stattgefunden, könnte diese kompakte Faltung nun die Wechselwirkung von Imidazol mit an Tag gebundenen Ni erschweren und somit eine Elution verhindern. Die Klonierung von *ssuE* in einen Expressionsvektor mit *C*-terminalem His-Tag könnte dieses Problem möglicherweise lösen, da es zu einem besser zugänglichen Tag führen könnte. Auch die Verwendung von Kupfer-NTA könnte die Bindungsfähigkeit von SsuE verbessern, da es eine höhere Affinität zu Proteinen mit poly-His-Tag besitzt als Ni-NTA.

Weiterhin zeigte ein Vergleich der auf den Proteingelen sichtbaren Menge an isoliertem Protein mit der photometrisch bestimmten Konzentration, dass nach der Elution ein großer Teil des Enzyms verloren ging. Eine nähere Analyse der Entsalzung mittels PD10-Säule ergab in der Folge, dass SsuE dazu neigt, bei diesem Schritt länger auf der Säule zu verbleiben, als aufgrund der Herstellerangaben erwartet wurde. Das bedeutete, dass während des Entfernens des Imidazols aus der Proteinprobe mehr Puffer eingesetzt werden musste, um das Protein von der Säule wieder zu eluieren. Während normalerweise ein Volumen von 3.5 mL Puffer genügen sollte, um das Protein von der PD10-Säule zu spülen, konnte SsuE erst nach einem Gesamtvolumen von 8 mL Puffer zurückgewonnen werden. Dabei war das Protein nur in den letzten 4 mL enthalten. Es wurde vermutet, dass SsuE, welches mit 23.56 kDa kein großes Protein ist, durch eine kompakte Faltung zusätzlich stark verkleinert wird. Seine Retentionszeit beim Entsalzen mittels Größenausschlussverfahren durch die PD10-Säule wird dadurch deutlich verlängert.

Nachdem die für die Halogenierungsassays benötigten Proteine ComH und SsuE erhalten wurden, wurden diese auf Aktivität überprüft. Die Aktivität des NADPH-abhängigen SsuE konnte durch den Verbrauch der Co-Faktoren NADPH und FAD ermittelt werden, wobei die Detektion des Verbrauchs über UV-VIS-Spektren erfolgte. NADPH weist ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und FAD bei 375 sowie 450 nm auf.¹¹² Bei der Übertragung von Elektronen von NADPH auf FAD ($\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$; $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$) durch SsuE sollte die Absorption bei diesen Wellenlängen abnehmen. Durch das Mischen von NADPH, FAD und SsuE bei Raumtemperatur und Aufnehmen von UV-VIS-Spektren über 5 min konnte der Verbrauch von NADPH beobachtet werden (Abbildung II-12-B). Die Kurven weisen zwar eine Abnahme der Absorption beim 340 nm auf, jedoch bleiben sie im Bereich des Maximums von FAD, 450 nm, konstant. Dies muss nicht zwangsmäßig bedeuten, dass FAD nicht zu FADH_2 reduziert wurde, da FADH_2 bei Kontakt mit Sauerstoff rasch wieder zu FAD oxidiert werden kann.¹¹² Damit also ausgeschlossen werden konnte, dass NADPH auch ohne das Einwirken von SsuE oxidiert, wurde der gleiche Versuch ohne die Zugabe von SsuE durchgeführt. Bei dieser Negativkontrolle war deutlich zu erkennen (Abbildung II-12-A), dass unter Ausschluss von SsuE kein NADPH verbraucht wurde. Somit konnte die Funktionsfähigkeit von SsuE bewiesen werden. Es galt anschließend, auch die Aktivität von ComH zu überprüfen. Hierfür sollte ein fast identischer Versuch unternommen werden, bei dem jedoch ComH anstatt von FAD zugesetzt wurde. Durch den Verbrauch von NADPH sollte dann festgestellt werden, dass ComH FAD gebunden hatte und damit aktiv war. Unglücklicherweise war jedoch keine Abnahme der Absorption bei 340 nm zu sehen (Abbildung II-12 Abbildung II-12-C).

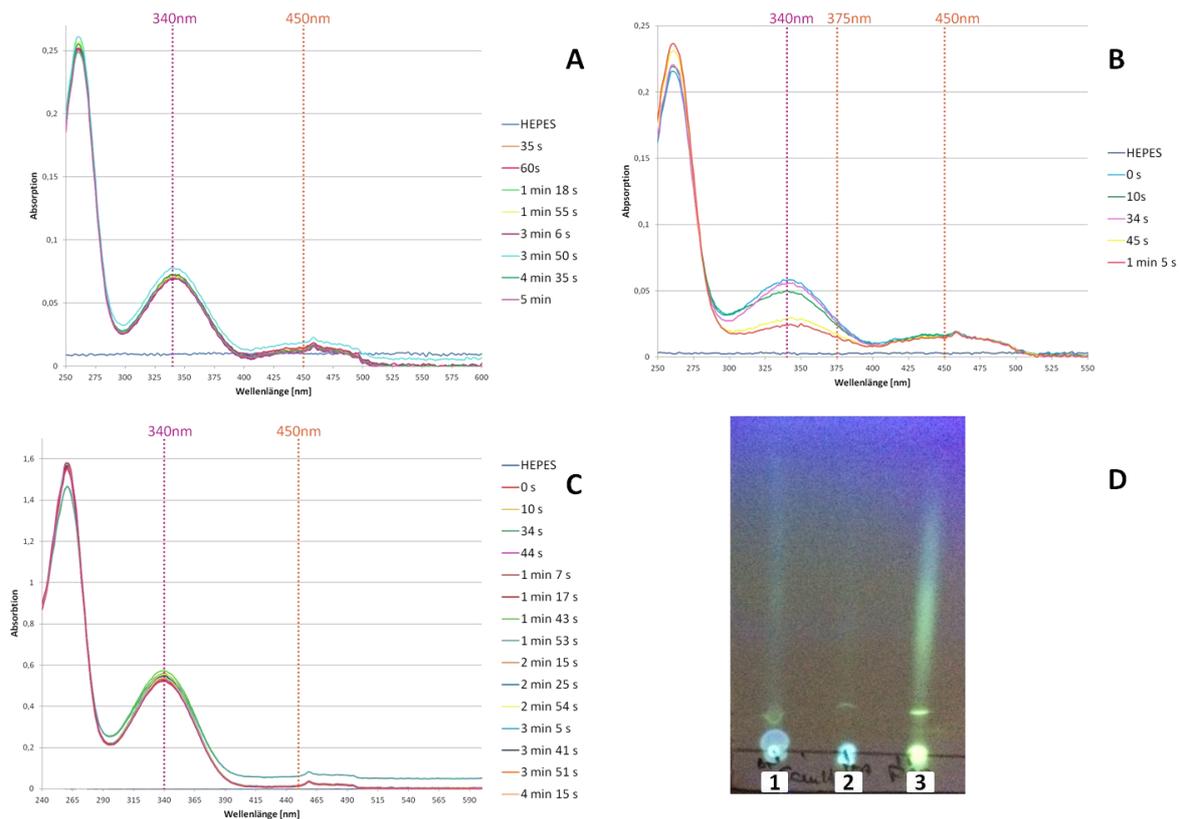


Abbildung II-12. UV-VIS-Spektren zum Verbrauch von NADPH und FAD durch die Flavin-Reduktase SsuE. A) Negativkontrolle: kein Verbrauch von NADPH (340 nm) beim Zusammengeben von NADPH und FAD; B) positiver Aktivitätstest: Verbrauch von NADPH beim Zusammengeben von NADPH und FAD mit SsuE; C) Aktivitätstest: scheinbar kein Verbrauch von NADPH beim Zusammengeben von NADPH und ComH mit SsuE; D) DC-Untersuchung von ComH auf gebundenes FAD durch Denaturierung. 1 = Denaturierung von ComH bei 95°C für 5min; 2 = Denaturierung von ComH durch Zugabe von 2µL TFA; 3 = FAD; Eluent: *tert*-BuOH/Aceticacid/H₂O 12:3:5.

Mit der Idee, dass möglicherweise die Konzentration des am ComH gebundenen Co-Faktors FAD für eine Detektion der Aktivität zu niedrig war, sollte FAD auf anderem Weg nachgewiesen werden. Hierzu wurde ComH durch Zugabe von TFA oder durch kochen (5 min, 95 °C) denaturiert. Dabei sollte das FAD von ComH abgespalten werden. Anschließend wurde eine Dünnschichtchromatographie (DC) mit kommerziell erhältlichem FAD als Referenz durchgeführt. So konnte in allen drei Proben die Anwesenheit von FAD gezeigt werden (Abbildung II-12-D). Es ist daher davon auszugehen, dass ComH das benötigte FAD gebunden hatte. Jedoch könnte die Vermutung des zu niedrigen Gehalts an gebundenem FAD evtl. berechtigt sein. Durch zusätzliche FAD-Zugabe während des Assays sollte es möglich sein, mehr ComH-Moleküle ohne FAD in die entsprechende Holo-Form mit FAD zu überführen, so dass dies kein Hindernis für eine erfolgreich enzymatische Chlorierung darstellen sollte.

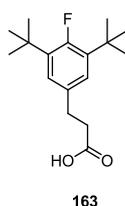
II.4.4. Halogenierungsassays

Die Halogenierungsassays konnten nach Synthese der mutmaßlichen Substrate und Überexpression der funktionsfähigen Enzyme durchgeführt werden. Die Analysen sollten aufgrund der geringen Konzentrationen der eingesetzten Substrate und der möglicherweise daraus resultierenden Produkte mittels HPLC und MS erfolgen. Die Assays beinhalteten 1.25 mg Substrat, 10 μ M FAD, 2.5 mM NADPH sowie jeweils 25 μ M ComH und SsuE. Das Endvolumen wurde mit HEPES-Puffer (25 mM, mit 10 mM NaCl, pH 7.0) aufgefüllt. Dabei wurde die Menge des eingesetzten Substrats so gewählt, dass die Substrat-Endkonzentration der Assaylösung eine HPLC-Detektion möglich machte. Die Mischung wurde 1 h bei 30 °C und 300 rpm inkubiert. Als Substrate wurden die oben vorgestellten potenziellen Kandidaten **43-46** und als aktivierte Thioester **154** und **157** eingesetzt. Für die HPLC-MS-Analyse wurden verschiedene Aufarbeitungsmöglichkeiten getestet, um die Proteine für eine bessere Detektierbarkeit der Substrate bzw. eventueller Produkte abzutrennen. Da die Substrate als auch die chemisch synthetisierten putativen Produkte aufgrund der polaren funktionellen Gruppen keine Ionenpeaks in der ESI-MS-Analyse lieferten, lag das Hauptaugenmerk zunächst auf der Gewinnung von sauberen, aussagekräftigen HPLC-Chromatogrammen. Zum einen wurde das Fällen der Proteine mittels TFA oder die Extraktion der organischen Verbindungen in Ethylacetat getestet. Desweiteren wurden Zentrifugationsfilter mit Membranen, die Proteine zurückhalten sollten, angewendet. Jedoch konnten keine zufriedenstellende, saubere HPLC-Chromatogramme gewährleistet werden, womit eine eindeutige Aussage zu einer evtl. erfolgten Chlorierung nicht möglich war. Eine Überlegung zur Lösung dieses Problems lag in der Derivatisierung der Substrate bzw. Produkte und deren Messung durch Gaschromatographie (GC)-MS. Als eine schnelle und einfache Methode zur Derivatisierung der Analyten hat sich das Veresteren der Carboxylgruppe durch Behandlung mit einer 1.25 M HCl in Methanol-Lösung erwiesen. Die Test-Derivatisierungen mit den reinen Substraten als auch Produkten funktionierte einwandfrei. Als diese Methode auf die Assay-Lösungen angewendet wurde, konnte außer den Signalen der Derivatisierungslösung keine weiteren erkannt werden. Dies ließ darauf schließen, dass die Konzentration der injizierten Proben im Verhältnis zur Derivatisierungslösung zu gering war. Im nächsten Versuch wurde die Assaylösung zunächst über Zentrifugationsfilter abzentrifugiert und anschließend mittels Gefriertrocknung von der wässrigen Lösung befreit. Der Rückstand wurde mit der HCl-MeOH-Lösung versetzt, um eine Veresterung der Edukte und Produkte zu erhalten. Leider gelang auch auf diesem Weg keine zuverlässige Detektion der Analyten mittels GC-MS. Es kann also auch noch keine Aussage über die Effektivität der Halogenierungsmethode mit aufgereinigten Enzymen gemacht werden. Der nächste Schritt in diesem Projekt muss daher die Optimierung der Aufarbeitungsstrategie nach Ende der Assayreaktion sein. Eine Möglichkeit wäre die Aufreinigung über die Festphasenextraktion.

Parallel zu den Halogenierungsassays mit isolierten Enzymen wurden Assays mit dem ComH-Zellüberstand durchgeführt. Ferner wurden, mit der Annahme, dass eine natürliche Umgebung der Halogenase eine Voraussetzung für das Stattfinden der Chlorierung sein könnte, auch Fütterungsexperimente unternommen. Die HPLC-Analysen dieser Experimente verliefen ähnlich wie die Analysen der Assays mit isolierten Enzymen und erlaubten keine tatkräftigen Aussagen über den Erfolg dieser Versuche.

II.5. Strukturaufklärung eines mutmaßlichen fluorierten Naturstoffes aus *Streptomyces* sp. TC1

Die Familie der halogenierenden Enzyme umfasst außer den in Kapitel II.4 erläuterten FADH₂-abhängigen Halogenasen weitere bemerkenswerte Biokatalysatoren. Zu dieser Enzymklasse gehören außer den FADH₂-abhängigen Halogenasen Häm- und Vanadium-abhängige Haloperoxidasen sowie Eisen-abhängige nicht-Häm-Halogenasen.¹¹³ Dabei beruht das Grundprinzip der enzymatischen Installation von Halogenatomen in organische Verbindungen auf der oxidativen Aktivierung der Halogene in Form eines Radikals oder Kations. Eine analoge Oxidation von Fluorid ist jedoch ausgeschlossen. In Folge dessen sind nur fünf Sekundärmetabolite bekannt, die eine C-F-Bindung aufweisen, wobei Fluoroacetat am häufigsten auftritt.^{114,115} O'Hagan *et al.* konnten zeigen, dass Fluoroacetat zusammen mit 4-Fluorothreonin in *Streptomyces cattleya* mittels einer einzigartigen Fluorinase (fIA) produziert wird.¹¹⁶ fIA ermöglicht über eine nukleophile Halogenierung von S-Adenosyl-L-methionin (SAM) die Bildung einer C-F-Bindung. Das so entstandene 5'-Fluorodesoxyadenosin (5'-FDA) wird anschließend in Fluoroacetat und 4-Fluorothreonin umgewandelt. Alle bisher bekannten und verifizierten fluorierten Naturstoffe entstehen biosynthetisch durch den Einbau von Fluoroacetat. Jedoch konnte bis vor kurzem kein Naturstoff, der ein sp²-gebundenes Fluorid enthielt, identifiziert werden. Marimuthu *et al.* veröffentlichten kürzlich eine interessante Arbeit,¹¹⁷ in der die Isolierung, Charakterisierung und Strukturaufklärung von 3-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-fluorophenyl)propansäure (**163**, Abbildung II-13) aus *Streptomyces* sp. TC1 präsentiert wurde.¹¹⁸



163

Abbildung II-13. 3-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-fluorophenyl)propansäure (**163**).

Im Hinblick auf eine mögliche Entdeckung eines Enzyms, das Aromaten fluorieren kann, wurde unsere Aufmerksamkeit geweckt. Bei genauer Analyse der zu **163** publizierten Daten fielen einige Dinge auf. Erstaunlicherweise wies das ¹³C-NMR-Spektrum sechs Signale im aromatischen Bereich auf, obwohl aufgrund des symmetrischen Aufbaus von **163** nur vier Signale zu erwarten waren. Auch im ¹H-NMR-Spektrum waren zwei Signale für aromatische Protonen sowie zwei Peaks für die chemisch und magnetisch äquivalenten *tert*-Butyl-Reste angegeben (Abbildung II-14).

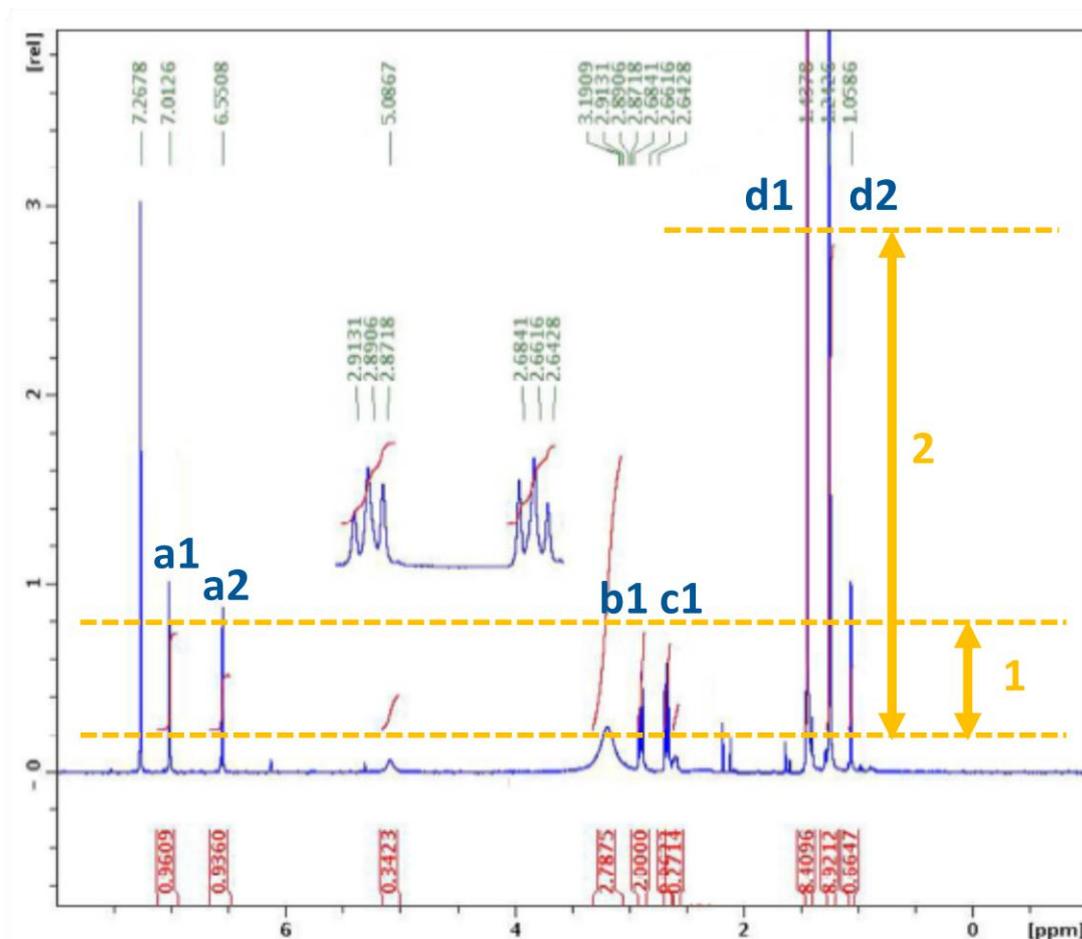


Abbildung II-14. Kopie des von Marimuthu *et al.* angegebenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **163**.¹¹⁷

Desweiteren wurden keine C-F- oder F-H-Kopplungskonstanten berichtet und das extrem breite Signal im $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektrum war für kleine Organofluor-Verbindungen sehr ungewöhnlich.¹¹⁹ Als zudem Unstimmigkeiten im dargelegten Massenspektrum (Peak bei 280.18 anstatt im erwarteten Bereich für $[\text{M} + \text{H}]^+ = 281.1$) erkannt wurden, haben wir in Kooperation mit Frau Stefanie V. Kohlhepp aus der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Tanja Gulder das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aus der Publikation ausführlicher analysiert. Dabei fiel uns auf, dass bei der Integration der Peaks die unter dem NMR-Spektrum angezeigten Werte nicht zu den rot dargestellten graphischen Integralen im Spektrum passten. Marimuthu *et al.* hatten scheinbar das Integral vom Methylensignal b1 auf 2.00 kalibriert. Der Abstand zwischen den zwei unteren gestrichelten Linien (Doppelpfeil 1) in Abbildung II-14 entspricht der Länge des Integrals von b1 und ergibt damit zwei Protonen. Demnach trifft die Anzahl von zwei Protonen auch auf den Peak c1 zu, wie im Originalbericht geschildert wurde. Jedoch zeigt der zu a1 zugehörige Wert unter dem Spektrum ein Proton (0.9609) an, während der Vergleich der graphischen Integrallängen dem Signal a1 eindeutig zwei Protonen zuweist. Damit wird a2 mit einer halb so großen Integrallänge wie a1 ein Proton zugeordnet. Auf diese Weise konnten auch die

Diskrepanzen bzgl. der Integrale von d1 und d2 verdeutlicht werden. Der Doppelpfeil 2 (Abbildung II-14) hebt die Integrallänge von d2 hervor, welche unübersehbar kleiner ist als d1. Jedoch sagt die Beschriftung unterhalb des NMR-Spektrums das Gegenteilige aus (d1 = 8.4096; d2 = 8.9212). Dieser Vergleich der graphischen Integrale mit den angegebenen Integralwerten zeigte, dass das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht nur falsch interpretiert wurde, sondern mit einiger Wahrscheinlichkeit die Werte aktiv manipuliert wurden. Durch den Vergleich der graphischen Integrallängen wurde von uns eine vorläufige Protonenverteilung aufgestellt, die annehmen ließ, dass das NMR-Spektrum auf eine 2:1-Mischung von zwei Verbindungen **164** und **165** mit ähnlichen Untereinheiten zurückzuführen war. Dabei wurden die Protonen a1, b1, c1 sowie d1 dem Molekül **164** und dementsprechend die Signale a2 und d2 **165** zugeteilt. Aufgrund der in der Originalpublikation gezeigten Kristallstruktur der isolierten Verbindung **163**, die richtig zu sein schien, lag die Vermutung nahe, dass eine sehr ähnliche Verbindung in der Mischung vorlag. Als ein geeigneter Kandidat bot sich Fenozan (**164**) an, das Hydroxy-Derivat von **163**. Das von uns gemessene $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **164** passte in der Tat perfekt auf die Peaks a1 bis d1 des Originalspektrums und enthielt ein zusätzliches Signal bei 5.09 ppm für das phenolische Proton (das auch im Originalspektrum bei 5.0867 ppm zu finden war, dort aber nicht diskutiert wurde) (Abbildung II-15, rot). Für den zweiten Bestandteil **165** des von uns angenommenen Gemisches wurde eine strukturell ähnliche Verbindung ohne den Propansäure-Rest erwartet. Die Hochfeldverschiebung der Signale a2 und d2 deutete darauf hin, dass es sich bei **165** nicht um eine aromatische Verbindung handelte. Das Benzochinon-Derivat **165** schien diese Bedingungen optimal zu erfüllen, wie das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beweist (Abbildung II-15, blau).

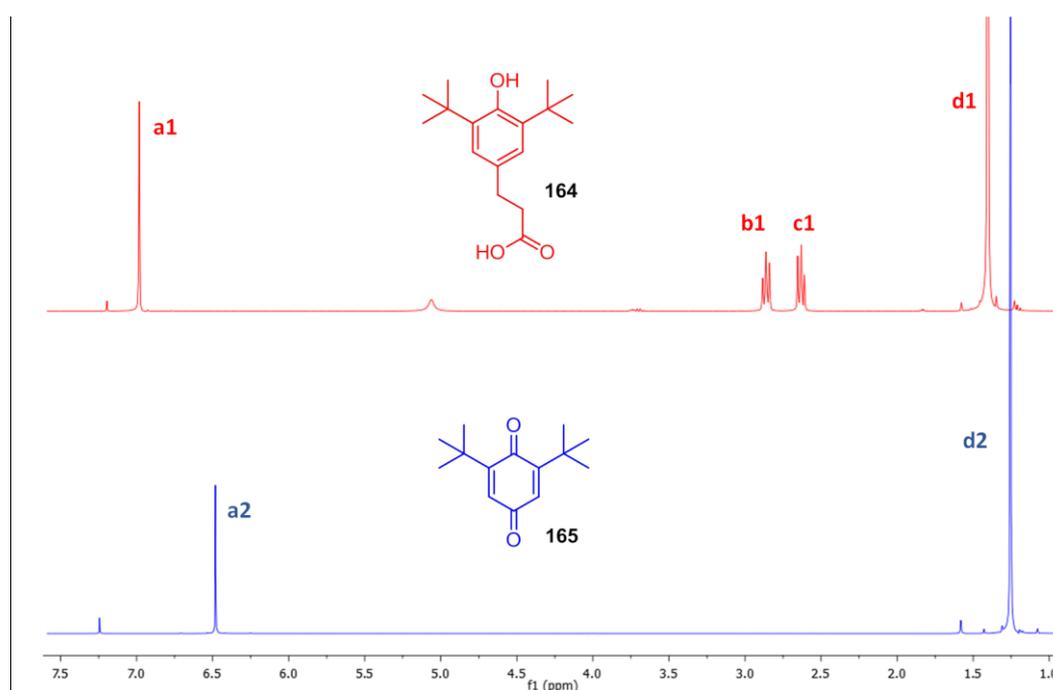


Abbildung II-15. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrn von **164** (rot) und **165** (blau).

Um unsere Annahme bzgl. der 2:1-Mischung zu stützen, haben wir eine Mischung aus **164** und **165** in der besagten Zusammensetzung hergestellt und ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen, welches in perfekter Weise das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wiedergab, das für die isolierte Verbindung **163** angegeben wurde (Abbildung II-16). Unsere NMR-spektroskopischen Analysen verifizieren damit eindeutig, dass das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, das Marimuthu *et al.* als Ergebnis der Naturstoffisolierung erhalten haben, nicht zu 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-fluorophenyl)propansäure gehörte, sondern zu **164** sowie **165** in einem 2:1-Verhältnis. Die Isolierung des ersten aromatischen Naturstoffs mit sp^2 -gebundenem Fluor konnte damit abschließend widerlegt werden. Parallel zu unseren Arbeiten konnten O'Hagan *et al.*¹¹⁹ durch den Vergleich der von Marimuthu *et al.* angegebenen spektroskopischen Daten mit denen der synthetisch hergestellten Verbindung **163** ebenfalls beweisen, dass Marimuthu *et al.* nicht **163** isoliert hatten.

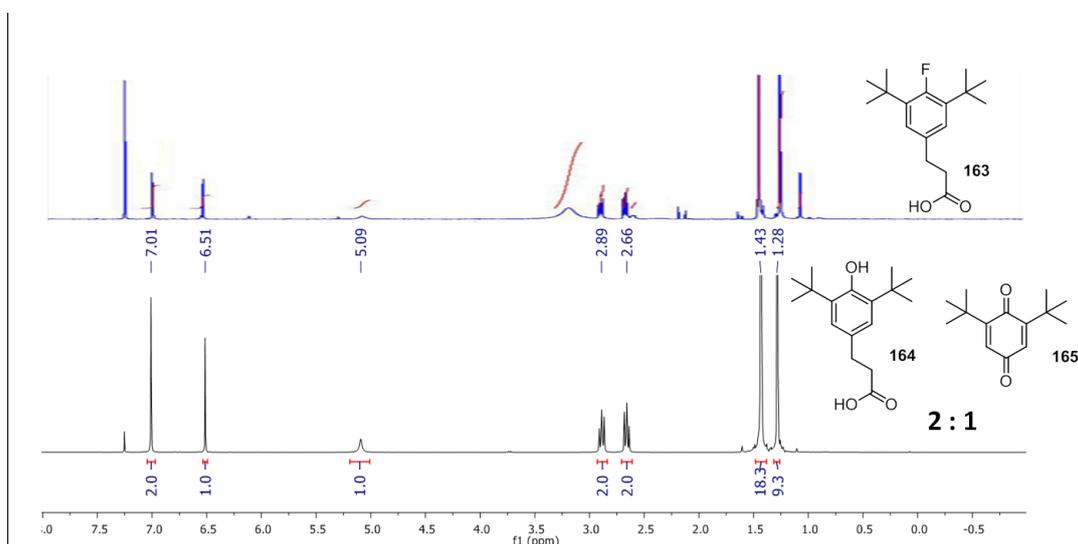
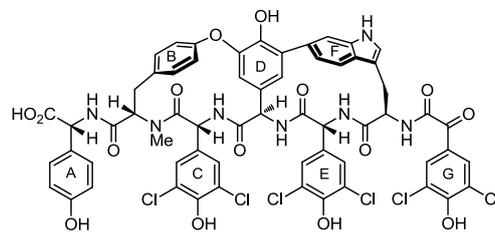


Abbildung II-16. Vergleich der Kopie des Originalspektrums von **163** mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines 2:1-Gemisches aus **164** und **165**.

Es liegt nahe, dass Marimuthu *et al.* bei dem Versuch einen Naturstoff aus *Streptomyces* sp. TC1 zu isolieren, Bestandteile ihres Laborequipments aus Plastik extrahiert haben, da **164** als auch **165** Zersetzungsprodukte der kommerziellen Verbindungen Stabiliff¹²⁰ und Irganox 1010¹²¹ sind, die in der Parfüm- und Plastik-Industrie Verwendung finden.

II.6. Zusammenfassung

Nicht-ribosomale Peptide mit Biaryl-Strukturelementen sind eine Klasse biomedizinisch und chemisch hoch interessanter Naturstoffe. Dies wird besonders deutlich am wohl prominentesten Beispiel, dem für die Veterinär- und Humanmedizin enorm wichtigen Antibiotikum Vancomycin (**10**). Auch das in dieser Dissertation bearbeitete Complestatin (**13**), das von *Streptomyces lavendulae* produziert wird, ist ein beeindruckender Vertreter dieser Verbindungsklasse. Nicht nur die zahlreichen pharmazeutisch relevanten Eigenschaften, wie insbesondere die anti-HIV-Wirkung, sondern auch die Komplexität des strukturellen Aufbaus, hervorgerufen durch mehrere stereogene Zentren, vor allem durch eine axial chirale Biarylbrücke, machen die Synthese von **13** lohnenswert.

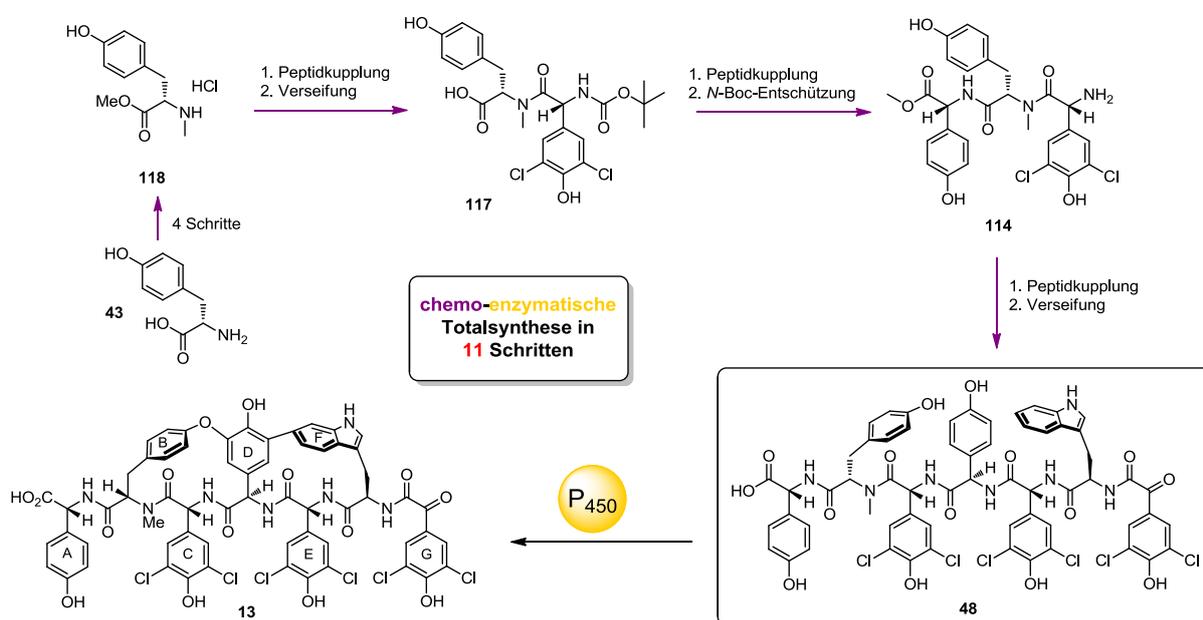


Complestatin (**13**)

Die Synthese strukturell komplexer, quervernetzter Peptide wie **13** ist nach wie vor eine große Herausforderung. Dies zeigen die drei bislang publizierte Routen zu diesem Molekül deutlich. Insbesondere die Notwendigkeit der regio- und stereoselektiven Einführung der Biaryl-Strukturelemente führt zu sehr langen Synthesestrategien mit komplexen, orthogonalen Schutzgruppenstrategien und damit in letzter Konsequenz zu sehr geringen Gesamtausbeuten. Diese Schwierigkeiten bei der Synthese solcher Verbindungen stehen in scharfem Kontrast mit der fließbandartigen, hoch effizienten Biosynthese dieser Peptide an nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen. Dort wird zunächst aus nicht weiter funktionalisierten Aminosäurebausteinen ein lineares Vorläufermolekül aufgebaut, in das am Ende der Biosynthese durch spezifische Cytochrom-P450-Enzyme oxidativ die Biaryl-Elemente eingeführt werden. Die Kombination der Selektivität der dabei beteiligten Biokatalysatoren mit der Effizienz moderner Peptid-Syntheseverfahren könnte es ermöglichen, kurze, chemo-enzymatische Synthesewege zu Verbindungen wie **13** zu etablieren. Ein Hauptziel dieser Arbeit war es daher, effiziente synthetische Zugänge zu linearen Peptidvorläufern von Biaryl-Peptiden zu erarbeiten und erste Untersuchungen zu chemo-enzymatischen Kreuzkupplungsreaktionen durchzuführen.

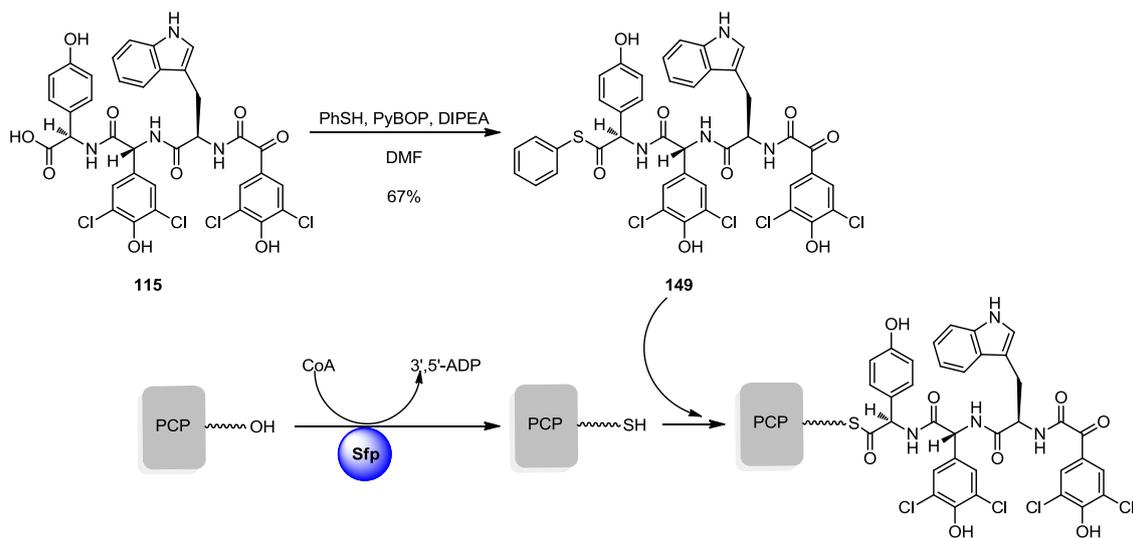
Die anfängliche Idee, die lineare Vorstufe von **13**, Verbindung **48**, die Biosynthese nachahmend, mittels Festphasenpeptidkupplung Baustein für Baustein aufzubauen, scheiterte an der Bindungsknüpfung zwischen *N*-Methyl-*O*-*tert*-butyltyrosin (**87**) und *N*-Alloc-3,5-dichlor-*D*-4-HPG (**58**). Trotz intensiver Versuche, mit Hilfe diverser Kupplungsreagenzien sowie Basen eine Peptidbindung zwischen **87** und **58** herzustellen, konnte dieses Ziel nicht erreicht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Grund hierfür die sterische Hinderung am *N*-methylierten Nucleophil **87**, kombiniert mit der Sensitivität des Elektrophils **58** gegenüber Racemisierung ist.

Alternativ zur Synthese von **48** an der festen Phase wurde daher im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich eine kurze Synthesemethode mittels klassischer Peptidkupplungschemie in der flüssigen Phase entwickelt. Die gesamte Synthese umfasst lediglich 10 Schritte in der längsten linearen Sequenz und ist damit nur halb so lang wie bislang publizierte Syntheserouten zu **13**. Dies wurde erreicht durch eine hoch konvergente Synthesestrategie, in der zunächst zwei Tripeptid-Fragmente parallel zueinander dargestellt und schließlich zum Heptapeptid **48** verbunden wurden. Die Ausbeuten zu den Tripeptiden wurden dabei durch intensives Screening diverser Kupplungsbedingungen auf allen Stufen optimiert. Die nun etablierte Synthese liefert einen schnellen Zugang zu **48**, dem Substrat für die biokatalytische Installation der Biaryl-Strukturelemente.

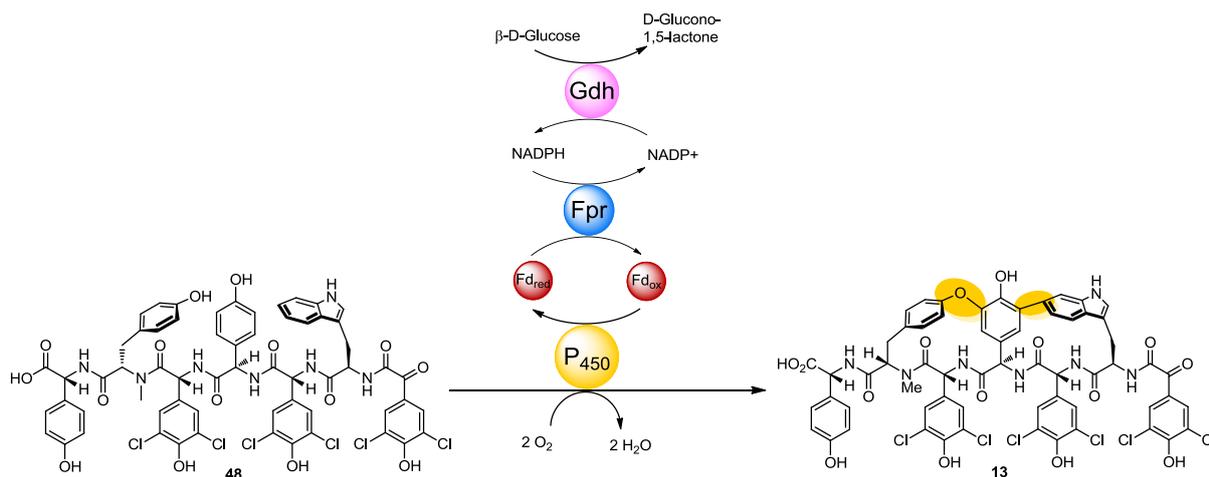


Bevor die lineare Peptidkette **48** für die enzymatische Biarylether- und Biaryl-Kupplung genutzt werden konnte, musste sie auf eine PCP-Domäne geladen werden. In der Biosynthese von **13** ist die Peptidkette nämlich während der Kettenverlängerung an PCP-Domänen gebunden. Es wird angenommen, dass die lineare Vorstufe **48** auch während der oxidativen Zyklisierung in PCP-gebundener Form vorliegt. Daher wurde vermutet, dass für die Substraterkennung von Seiten der CYP450-Enzyme ComI und ComJ (bereitgestellt von Herrn René Richarz) eine Bindung des Substrats

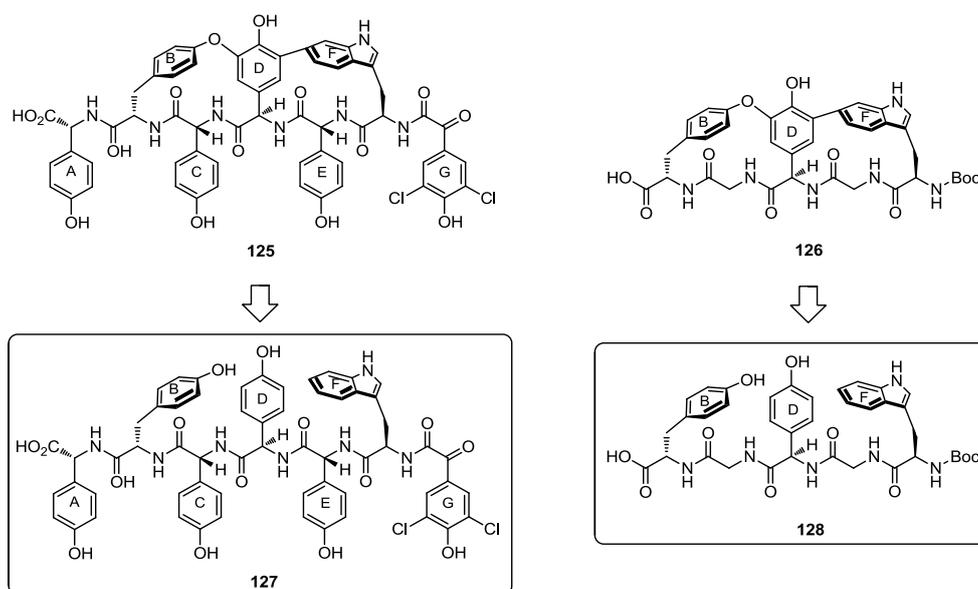
an eine PCP-Domäne notwendig ist. Für die Beladung der PCP-Domäne musste **48** als Thioester aktiviert werden. Dies sollte durch Überführung von **48** in die SNAc- oder Thiophenol-Form erfolgen. Die Aktivierungsexperimente wurden zunächst anhand des Tetrapeptids **115** zu Phenylthioester **149** optimiert. Dieser wurde für erste PCP-Ladeassays verwendet. Mit Hilfe dieses Modellsystems konnte erstmals eine Methode zur direkten Beladung der Thiofunktion von PCP-Domäne durch Umesterung am Enzym entwickelt werden.



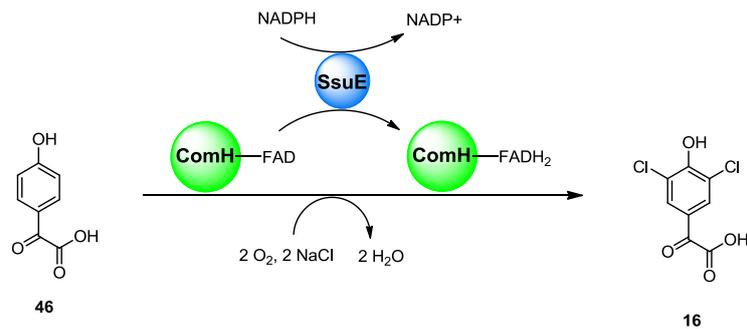
Die biokatalytische Generierung der Biarylether- und Biaryl-Bindung in entsprechenden Enzym-Assays konnte trotz intensiver Bemühungen noch nicht nachgewiesen werden. Da an dem Zyklisierungsschritt viele enzymatische Komponenten beteiligt sind, stellen die Aufarbeitung und Analyse der Reaktionsansätze eine große Herausforderung dar. So gelang es trotz der Verwendung unterschiedlicher Methoden (z. B. Proteinfällung, Festphasenextraktion) bislang nicht, ein effizientes Protokoll zur quantitativen Abtrennung der Proteinkomponenten aus den Reaktionsansätzen zu erreichen. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Möglichkeiten der Festphasenextraktion aus zeitlichen Gründen noch nicht ausgeschöpft wurden. Ein weiteres Problem könnte die zur Abspaltung der PCP-gebundenen Substanzen nötige Funktionalisierung mit Hydrazin sein. Die hohe Polarität der Hydrazin-Einheit führt zu sehr kurzen Retentionszeiten der Analyten in der HPLC-Analytik, ähnlich der in den Assays verwendeten Proteine. Dies resultiert aufgrund der hohen Signalintensität der Proteine womöglich zur Maskierung der erwarteten Produkt-Signale. Eine Lösung dieses Problems könnte die Verwendung eines weniger polaren Hydrazin-Derivates in der Abspaltungsreaktion des mutmaßlich entstandenen Produkts von der PCP-Domäne sein.



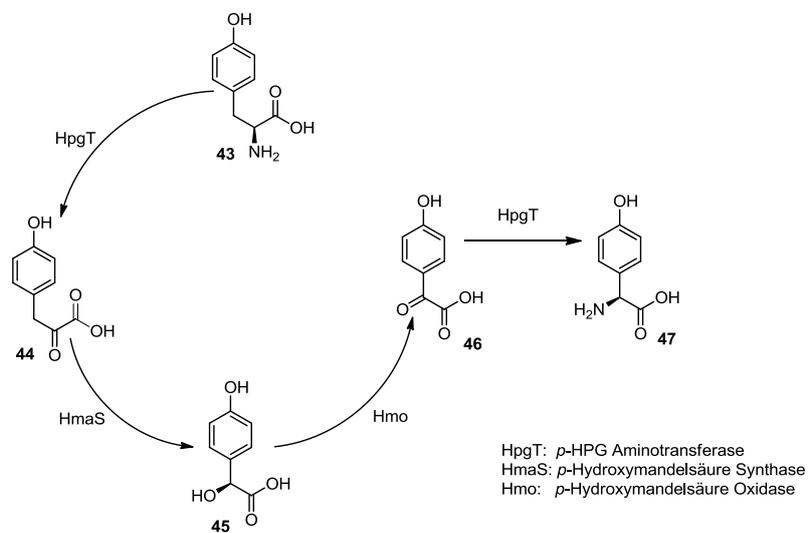
Parallel zur Synthese von **48** wurden auf analoge Weise lineare Peptidketten (**127**, **128**) von zwei vereinfachten Complestatin-Derivaten (**125**, **126**) hergestellt. Diese sollen zukünftig als Testsubstrate verwendet und auf biologische Aktivität geprüft werden. Dabei wurden im Fall von **127** ausschließlich nicht-chlorierte D-4-HPG-Bausteine (**47**) installiert. Das zweite Derivat **126** wurde nur auf die an der Zyklisierung beteiligten aromatischen Elemente reduziert.



Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, den Zeitpunkt der Chlorierung in der Biosynthese von **13** durch das Halogenierungsenzym ComH zu ermitteln. Hierzu sollten Halogenierungsassays unter Verwendung von heterolog produziertem ComH durchgeführt werden.

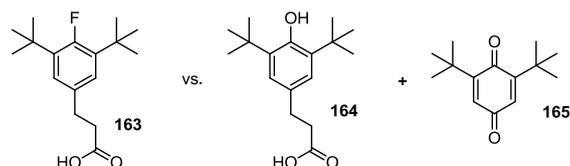


Die fünf vermuteten, potenziellen Substrat-Kandidaten (**43 - 47**) stammen aus der Biosynthese des L-HPG (**L-47**).

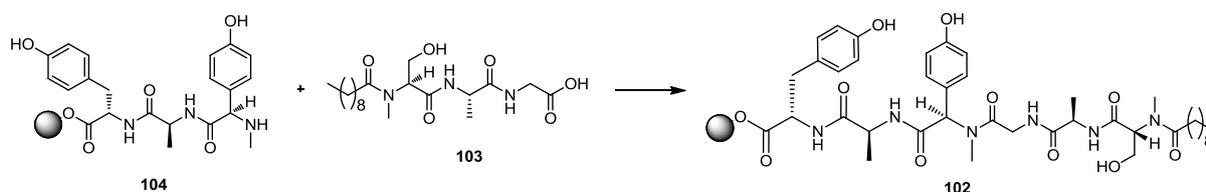


L-HPG (**L-47**) ist einer von zwei chlorierten Bausteinen in Complestatin (**13**). Der zweite chlorierte Baustein ist eine Zwischenstufe **46** im Biosyntheseweg von **L-47**. Während vier der potenziellen Substrate kommerziell erhältlich waren, wurde die Ketosäure **46** synthetisch hergestellt. Außerdem konnte in zwei von fünf Fällen die aktivierten Thioester-Substrate in Form der entsprechenden SNAc-Derivate (**154**, **157**) synthetisiert werden. Zu diesen zwei Substraten wurde auch jeweils das erwartete Produkt (**151**, **16**) hergestellt, womit Referenzen für HPLC-MS- bzw. GC-MS-Analysen erhalten wurden. Für die Durchführung der Assays wurden die benötigten Enzyme, das Flavin-abhängige ComH und die Flavin-Reduktase SsuE erfolgreich kloniert, überproduziert und aufgereinigt. Nach der Durchführung der Halogenierungsassays traten ähnliche Probleme bei der Aufarbeitung und Auswertung auf, wie bei den Biarylkupplungsassays. Zudem war es aufgrund der Polarität der Substrate und der putativen Produkte nicht möglich, ESI-MS-Analysen durchzuführen. Um trotzdem eine massenspektrometrische Analyse der Assays zu ermöglichen, wurde eine Methode zur Derivatisierung und anschließender GC-Analyse etabliert. Während diese Methodik mit den entsprechenden Reinsubstanzen gut zu funktionieren schien, war deren Übertragung auf die komplexen Assaylösungen bisher nicht möglich.

Als die Isolierung des ersten, am Aromaten fluorierten Naturstoffs **163** veröffentlicht wurde, bot sich die Möglichkeit, das für die Fluorierung verantwortliche Enzym zu entdecken und zu charakterisieren. Fluorinasen, die Fluoride an einen aromatischen Ring installieren würden, sind bis dato nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch intensive Analyse der NMR-Spektren der publizierten Arbeit aufgeklärt werden, dass eben nicht der vermeintliche Naturstoff **163** entdeckt, sondern eine Mischung aus **164** und **165** in einem 2:1-Verhältnis isoliert wurde. Dabei handelt es sich vermutlich lediglich um aus dem Plastik des Laborequipments extrahierte Weichmacher.



In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit sollte eine SPPS-Methode für die Herstellung der linearen Peptid-Vorstufen für Verbindungen der Klasse der antibiotischen Arylomycine entwickelt werden. In der Tat gelang es eine Synthese-Methode an der festen Phase am Beispiel von **102** zu etablieren.

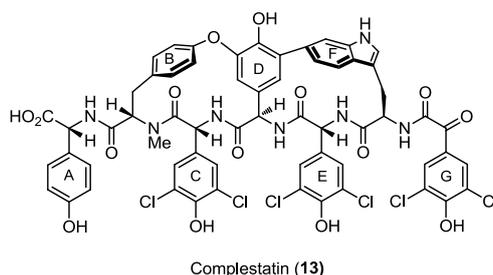


Dabei wurde das Tripeptid **104** an der festen Phase aufgebaut und mit dem von Frau Hanna Hong bereitgestellten Lipopeptid-Baustein **103** verknüpft. Durch Versetzung der Harz-gebundenen Peptidkette mit 0.6 %iger TFA Lösung in DCM konnte Vorstufe **102** eines Arylomycin-Derivates in einer sehr kurzen und trotz der Anwendung von SPPS konvergenten Syntheseroute erhalten werden.

Zusammenfassend ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die geplante Synthese der linearen Complestatin-Vorstufe **48** zu verwirklichen. Des Weiteren konnten die Peptidketten zweier vereinfachter Complestatin-Derivate (**127**, **128**) synthetisiert werden. Ferner war es möglich, eine Methode zur Beladung der PCP-Domäne mit Complestatin-Systemen am Beispiel des Tetrapeptids **115** zu etablieren. Zudem wurde eine effektive SPPS-Strategie entwickelt, die die schnelle Synthese von azyklischen Vorstufen des Arylomycin-Typs ermöglicht. Die in dieser Arbeit geleisteten Beiträge bilden somit die Grundlage, die chemo-enzymatische Totalsynthesen von Verbindungen des Complestatin- und des Arylomycin-Typs zeitnah abzuschließen.

II.7. Summary

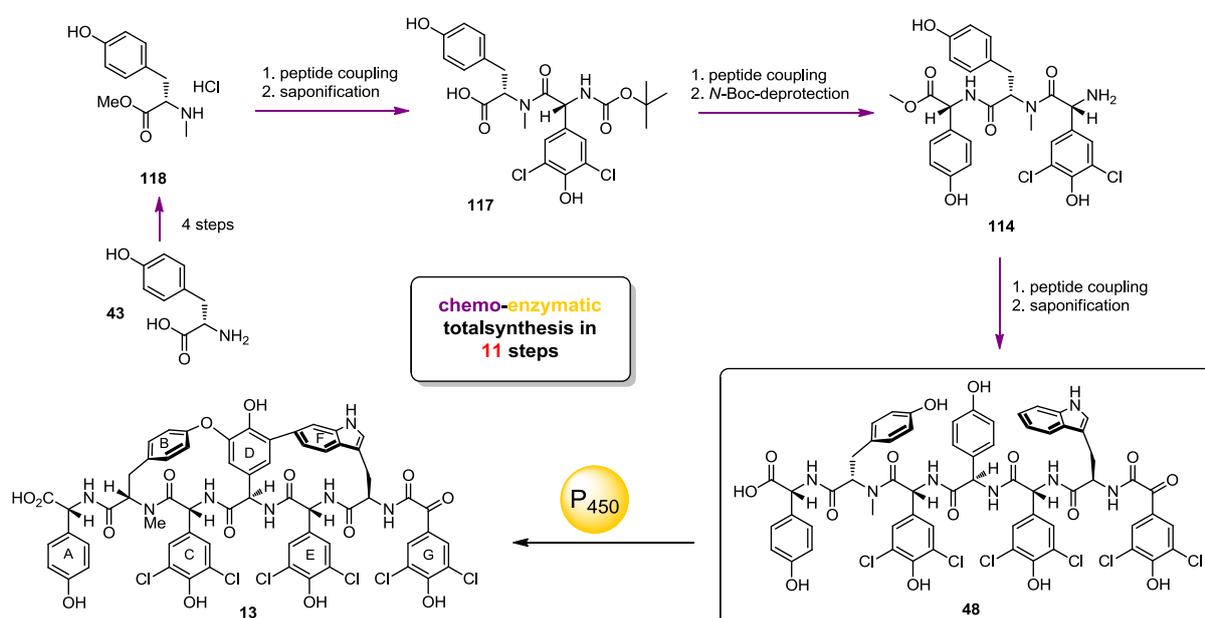
Non-ribosomal peptides bearing biaryl structural elements constitute a class of biomedically and chemically highly interesting natural products. This becomes particularly evident when looking at the most prominent example, the highly important veterinary and human antibiotic vancomycin (**10**). Complestatin (**13**), produced by *Streptomyces lavendulae*, is likewise an impressive member of this class of compounds. Not only the numerous pharmaceutically relevant properties, in particular the anti HIV activity, but also the structural complexity resulting from several stereogenic centers and the axially chiral biaryl bridge, render the synthesis of **13** a rewarding task.



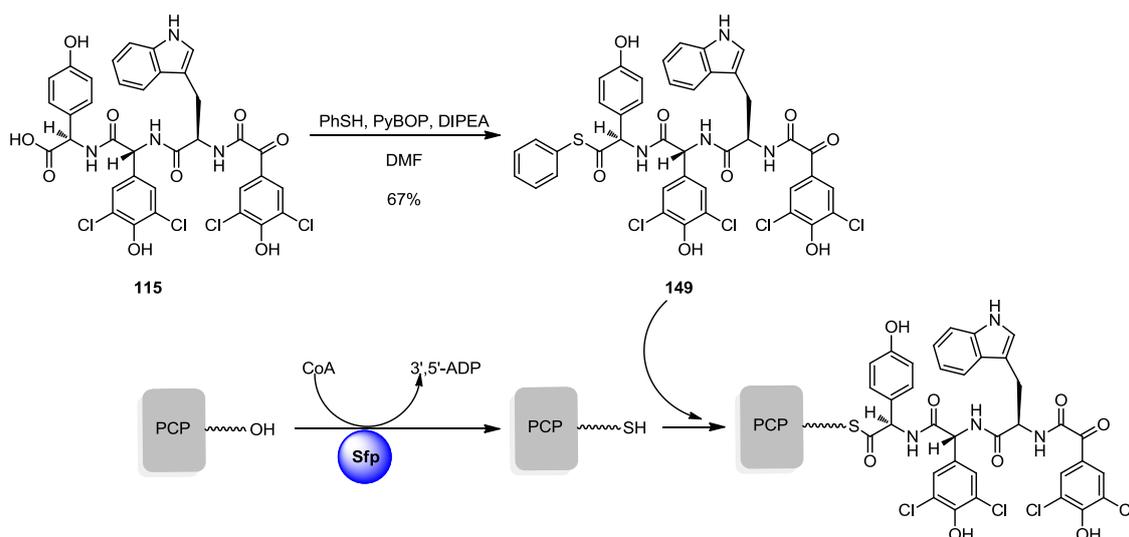
The synthesis of structurally complex cross-linked peptides such as **13** remains a formidable challenge. This is clearly evident from the three routes to this molecule published so far. In particular the need to regio- and stereoselectively introduce the biaryl structural elements leads to very long syntheses with complex orthogonal protective group strategies and, as a consequence, to very low total chemical yields. The difficulties associated with the synthesis of such compounds are in sharp contrast to the assembly-line like, highly efficient biosynthesis of these peptides on non-ribosomal peptide synthetases. In these systems, a linear precursor molecule is first assembled from not further functionalized amino acid building blocks, with final oxidative introduction of the biaryl elements catalyzed by specific cytochrome P450 enzymes. The combination of the selectivity of the involved biocatalysts with the efficacy of modern peptide synthesis might facilitate to establish short, chemo-enzymatic synthetic approaches to molecules such as **13**. One main objective of this work was thus to elaborate efficient synthetic routes to linear peptide precursors of biaryl peptides and to conduct first investigations into chemo-enzymatic cross-coupling reactions.

The initial idea to produce the linear precursor molecule of **13**, compound **48**, by mimicking its biosynthesis using solid-phase peptide chemistry, coupling building block by building block, failed as peptide bond formation between *N*-methyl-*O*-*tert*-butyltyrosin (**87**) and *N*-alloc-3,5-dichloro-D-4-HPG (**58**) was not feasible. Despite intensive attempts, the formation of a peptide bond between **87** and **58** by varying coupling reagents and employed bases failed. The results of this thesis show that the reason for this are the steric hindrance at the *N*-methylated nucleophile **87**, combined with the sensitivity of the electrophile **58** towards racemization.

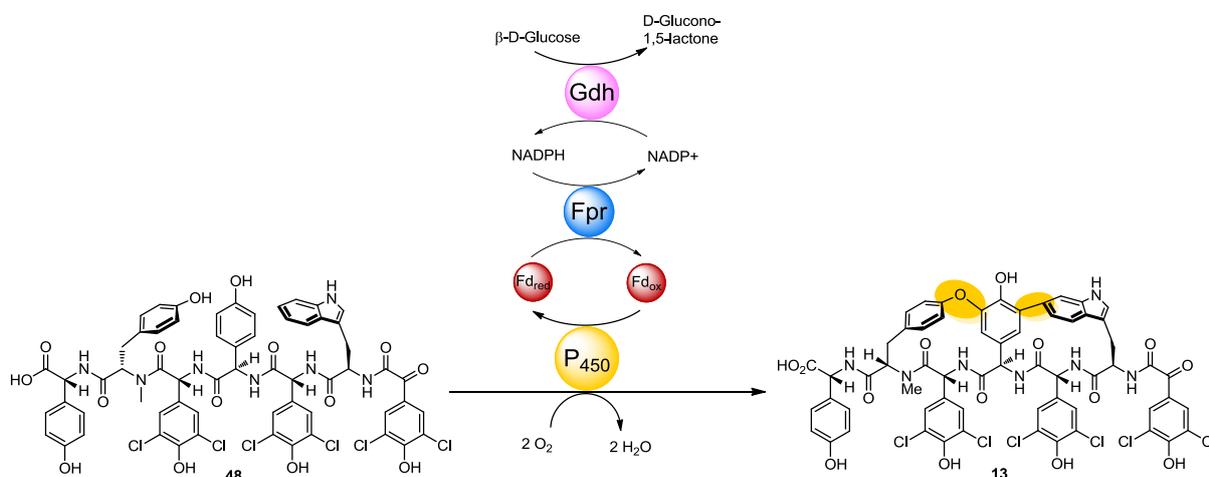
As an alternative to the preparation of **48** on a solid phase, a short synthetic route using classic peptide coupling chemistry in the liquid phase was successfully developed in the course of this work. The entire synthesis only comprises 10 steps in its longest linear sequence and thus is only half in length when compared to previously published synthetic routes towards **13**. This was achieved by a highly convergent synthetic strategy within which two tripeptide fragments are initially prepared in parallel and are finally fused to the heptapeptide **48**. The chemical yields towards the tripeptides were optimized for each step by extensive screening of diverse coupling conditions. The newly established synthesis constitutes a fast access to **48**, the substrate for the biocatalytic installation of the biaryl structural elements.



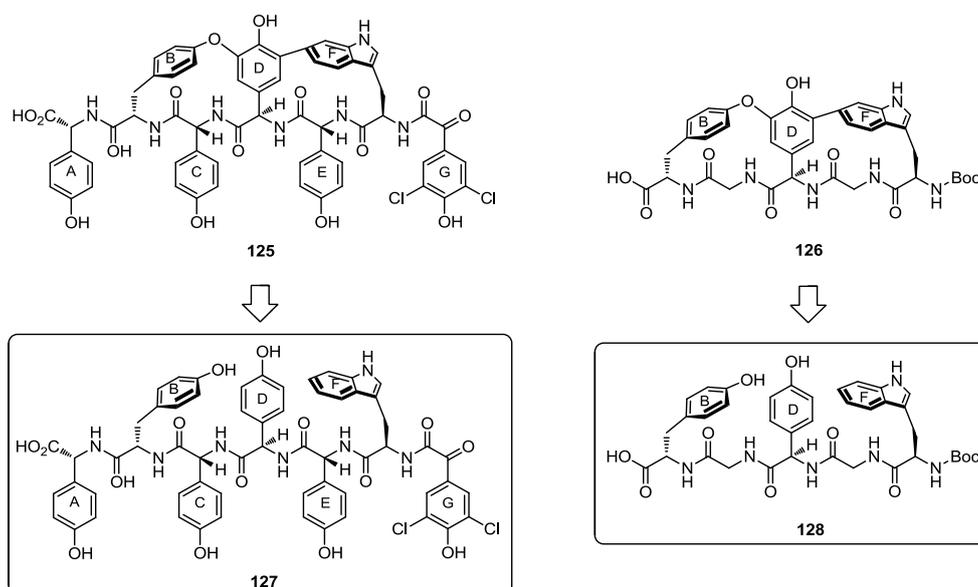
Prior to the utilization of the linear peptide chain **48** in enzymatic biaryl ether and biaryl coupling reactions, it needed to be transferred to a suitable PCP domain. In the biosynthesis of **13**, the peptide precursor is permanently bound to PCP domains during chain elongation. It is thus assumed that the linear precursor **48** is likewise still PCP-bound during oxidative cyclization. Likely, substrate binding to a PCP domain is required for substrate recognition by the CYP450 enzymes ComI and ComJ (provided by René Richarz). To facilitate loading of the PCP domain, **48** had to be activated as a thioester. This was thought to be achieved by transforming **48** into the respective SNAC- or thiophenol derivative. The activation experiments were initially optimized by functionalization of tetrapeptide **115** to phenyl thioester **149**. The latter was used in initial PCP loading assays. With the help of this model system, a method for the direct loading of the thiol function of PCP domains by transesterification directly at the enzyme was developed for the first time.



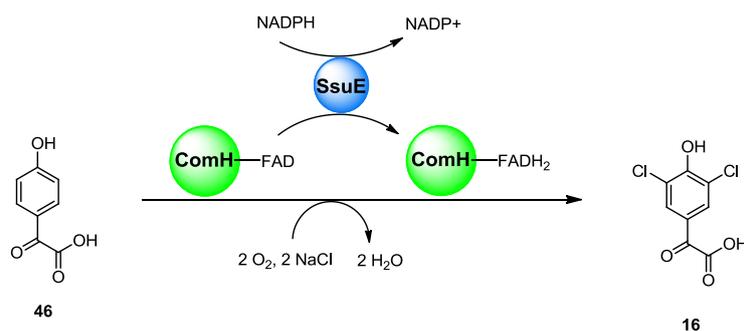
The biocatalytic generation of the biaryl ether and biaryl bonds by enzymatic transformations could not yet be verified, despite intensive efforts. Because of the involvement of many enzymatic components in the cyclization step, the work-up and analysis of the reactions are highly challenging. Although diverse methods were tested (e.g., protein precipitation, solid-phase extraction), the establishment of an efficient protocol to quantitatively remove protein components from the reaction mixtures was not yet possible. It is important to note that the possibilities of solid phase extraction have not exhaustively been tested for reasons of time. An additional potential problem could be the cleavage of the PCP-bound substances by functionalization with hydrazine. The high polarity of the hydrazine moiety results in short retention times of the analytes during HPLC analysis, were much like those of the proteins used in the assay. This might result in masking of the expected product signals by the high signal intensity of the proteins. A solution to this problem could be the use of less polar hydrazine derivatives during the cleavage of the putative products from the PCP domain.



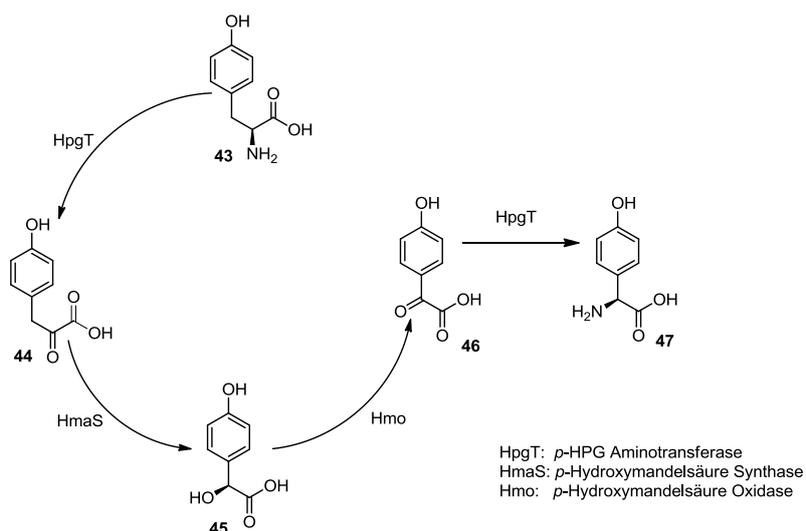
In parallel to the synthesis of **48**, linear peptide chains (**127**, **128**) of two simplified complestatin derivatives (**125**, **126**) were produced analogously. These will be used as future test substrates and will be assayed for biological activity. In case of **127**, exclusively non-chlorinated D-4-HPG (**47**) building blocks were installed. The second derivative **126** was reduced to the aromatic elements involved in cross-coupling reactions.



Another task of this work was to elucidate the timing of ComH-mediated halogenation in the biosynthesis of **13**. For this reason, halogenation assays using heterologously produced ComH were to be conducted.

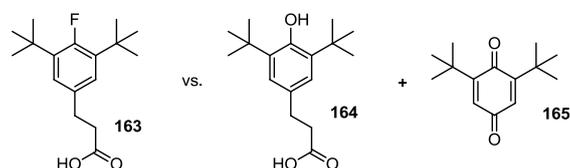


The five suspected, potential substrate candidates (**43** - **47**) are part of the biosynthesis of L-HPG (L-**47**).

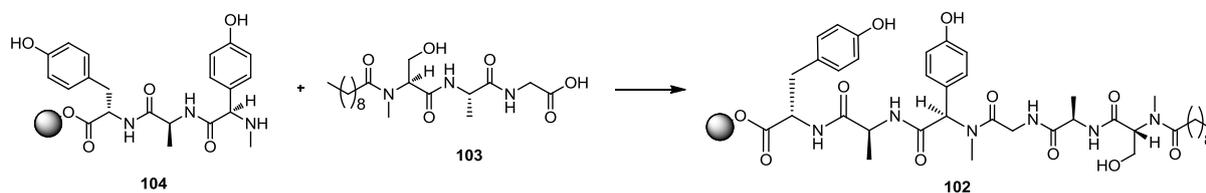


L-HPG (**L-47**) is one out of two chlorinated building blocks of complestatin (**13**). The second one is an intermediate **46** of the biosynthetic pathway of **L-47**. While four of the potential substrates were commercially available, keto acid **46** was prepared synthetically. In addition, the synthesis of the activated thioester substrates of two out of the five substrates was realized in form of the corresponding SNAc derivatives (**154**, **157**). For these two substrates, the expected enzymatic products (**151**, **16**) were likewise synthesized, thus obtaining reference material for HPLC-MS- or GC-MS-analysis. To enable the assays, the required enzymes, the flavin-dependent ComH and the Flavin reductase SsuE were successfully cloned, overproduced heterologously and purified. After the halogenation assays, similar problems during work-up and analysis, as described for the biaryl coupling assays above, occurred. In addition, HPLC-ESI-MS analysis of the substrates and putative products was not possible because of their high polarity. To facilitate mass spectrometric analysis of the assays, a method for compound derivatization and subsequent GC analysis was established. While this method worked well with the respective pure compounds, it was not yet compatible with the more complex assay solutions.

With the publication of the first natural product **163** bearing an aromatic fluorine substituent, the opportunity to discover and characterize an enzyme catalyzing this fluorination reaction arose. Fluorinases introducing fluorine onto an aromatic ring system are not known to date. In the course of this work, extensive analysis of the NMR spectra of the published work allowed to prove that the alleged newly discovered natural product **163** was indeed a 2:1 mixture of compound **164** and **165**. These molecules are likely only plasticizers, isolated from laboratory plastics.



In an additional subproject of this work, a SPPS method for the production of linear peptide precursors of compounds belonging to the class of the antibiotic arylomycins was to be developed. Indeed, establishment of a synthetic method on solid phase was successfully achieved.



In the course of this work, tripeptide **104** was assembled on solid phase and fused to lipopeptide building block **103** produced by Hanna Hong. By final treatment of the solid support-bound full peptide chain with a solution 0.6 % TFA in DCM, target precursor molecule **102** of an arylomycin derivate was produced in a very short and, despite application of SPPS, convergent synthetic route.

In summary, the presented work succeeded in the realization of the projected synthesis of the linear complestatin precursor **48**. Furthermore, the linear peptide chains of two simplified complestatin derivatives (**127**, **128**) were synthesized. In addition, it was possible to establish a method for loading PCP domains with complestatin precursors, as exemplarily shown for tetrapeptide **115**. Moreover, an efficient SPPS strategy was developed, that facilitates the fast synthesis of acyclic precursors of the arylomycin type. The results of this work thus form the basis to complete chemo-enzymatic total synthesis of complestatin- and arylomycin-type natural products in the near future.

III EXPERIMENTELLER TEIL

III.1. Verwendete Apparaturen und Messgeräte

Elektrophorese: Die elektrische Spannung für die Gelelektrophorese wurde mit Hilfe eines Electrophoresis Power Supply EV243 der Fa. *Consort* angelegt. SDS-PAGE wurde in *Bio-Rad* Mini Protean® Tetra System Gelkammern durchgeführt.

Elektroporator: Ein MicroPulser der Fa. *Bio-Rad* wurde für die Elektroporation von elektrokompetenten Zellen verwendet.

Gefriertrocknung: Wässrige Produkte wurden mit dem Gerät Alpha 2-4 von *Christ*, das an eine Chemistry-Hybrid-Pump-RC6-Pumpe von *Vacuubrand* angeschlossen war, getrocknet.

Gel-Bilder: Für die Dokumentation von Agarose-Gelen wurde das Bio-Imaging-System Gene Genius von *SynGene* benutzt. Das Gerät wurde über die GeneSnap-Software von derselben Firma gesteuert. SDS-Polyacrylamidgele wurden entweder ebenfalls mit dem Bio-Imaging-System abgebildet oder gescannt.

Heizblock/ Wasserbad: Zur Erwärmung von kleinen Proben wurden, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, der ThermoMixer C von *Eppendorf* oder das Wasserbad FBH 604 von *Fischerbrand* verwendet.

Inkubationsschüttler: Die Inkubationsschüttler stammen von der Fa. *Infors HT* mit den Modellen Multitron Standard und Ecotron.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): An der *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* wurden die ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren an den Geräten DP300 (300 MHz bzw. 75 MHz), DP400 (400 MHz bzw. 100 MHz) und DRX 500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren) der Fa. *Bruker* bei Raumtemperatur gemessen. An der *Technischen Universität München (TUM)* wurden die ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren an den Geräten AV200 (200 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren), AV360 (360 MHz), AV500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren) der Fa. *Bruker* bei Raumtemperatur gemessen. Die Geräte AV200, AV360 und AV500 wurden durch die Geräte AVHD400 (400 MHz bzw. 100 MHz), AVHD300 (300 MHz bzw. 75 MHz) bzw. AVHD500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren) der Fa. *Bruker* ersetzt. Die chemischen Verschiebungen δ sind in parts per million [ppm] angegeben und beziehen sich auf $\delta(\text{TMS}) = 0$. Als interner Standard wurden die deuterierten Lösungsmittel CDCl_3 , MeOD, DMSO- d_6 , Aceton- d_6 , CD_3CN sowie D_2O eingesetzt. Dabei dienten bei den ^1H -NMR-Spektren die Resonanzsignale der

Restprotonen [$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$, $\delta(\text{MeOD}) = 3.31$, $\delta(\text{DMSO-d}_6) = 2.50$, $\delta(\text{Aceton-d}_6) = 2.05$, $\delta(\text{CD}_3\text{CN}) = 1.94$, $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4.79$] und bei den ^{13}C -NMR-Spektren die entsprechenden ^{13}C -Resonanzsignale [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16$, $\delta(\text{MeOD}) = 49.00$, $\delta(\text{DMSO-d}_6) = 39.52$, $\delta(\text{Aceton-d}_6) = 29.84$, 206.26 , $\delta\text{CD}_3\text{CN}) = 1.32$, 118.26] der verwendeten deuterierten Lösungsmittel zur Kalibrierung. Zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten dienen die Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = doppeltes Dublett, dt = doppeltes Triplett, dq = doppeltes Quartett, ddd = dreifaches Dublett, td = Triplett von Dublett, m = Multiplett, br = breites Signal. Die Zuordnung der Signale erfolgte in einigen Fällen mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren (H,H-COSY, HMBC, HMQC und NOESY). Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz [Hz] angegeben und die Spektren wurden mittels MestReNova (*Mestrelab Research S. L.*) ausgewertet.

Massenspektroskopie (MS): Die Massenspektren, die an der *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* gemessen wurden, wurden von den Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektroskopie am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* unter der Leitung von Frau Dr. Engeser aufgenommen. Die Aufnahme der Elektrosprayionisations-Massenspektren (ESI-MS) und der High-Resolution-Massenspektren (HRMS) erfolgte an einem Time-of-Flight-Massenspektrometer (microTOF-Q, *Bruker Daltonics*). Für die Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI-MS) wurde das Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95 XL der Fa. *Thermo Finnigan* mit einer Beschleunigungsspannung von 70 eV verwendet. An der *TUM* wurden die ESI-MS entweder an einem *Advion* ExpressionL CMS-Gerät mit single-quadrupole mass analyzer, das zusammen mit einem *Peak Scientific* N118LA Stickstoffgenerator, einer *Edwards* RV12 Hochvakuumpumpe, einer *Camag* TLC-MS Interface und einer *Jasco* PU-1580 Intelligent HPLC-Pumpe betrieben wurde, oder an einem LCQ Fleet Ion Trap Massenspektrometer gekoppelt an ein UltiMate 3000 HPLC System (beides von *Thermo Scientific*) aufgenommen. Das Letztere wurde mittels Xcalibur Software gesteuert und die Ergebnisse der Messungen wurden mittels *Thermo* Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48 Software ausgewertet. Das *Advion*-MS-System wurde mit Hilfe von Mass Express Software gesteuert und die Auswertungen wurden mittels Data Express Software (beides von *Advion*) durchgeführt. Die Aufnahme von hochauflösendem ESI-MS erfolgte an dem Massenspektrometer *Thermo* LTQ FT Ultra. Die Massenspektrometer der HR-ESI-MS wurden ebenfalls mittels *Thermo* Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48 Software ausgewertet.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Die Amplifikation von DNA erfolgte entweder mittels Life Eco-PCR-Geräten der Fa. *Bioer* oder an einem TC-5000-PCR-Gerät der Fa. *Techne*.

Proteinkonzentrationsbestimmung: Proteinkonzentrationen wurden außer über den Bradford-Test mit Hilfe des Nanophotometer P330 von *Implen* bestimmt.

Zellaufschluss: Bakterienzellen wurden mit einem Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD2070 von *Bandelin* aufgeschlossen.

Zentrifugation: Es wurden die Zentrifugen Heraeus Multifuge X3R Centrifuge der Fa. *Thermo Scientific*, 24/6 der Fa. *VWR* und Centrifuge 5418R der Fa. *Eppendorf* verwendet.

III.2. Vektoren, Organismen und Primer

III.2.1. Vektoren

Tabelle III-1. Verwendete Vektoren.

Name	Verwendung	Eigenschaften	Herkunft
pGS21a	Expression <i>N</i> - und <i>C</i> -terminaler His ₆ -Fusionsproteine	<i>Amp</i> R, His-Tag (<i>N</i> - und <i>C</i> -Terminal), GST-Tag (<i>N</i> -Terminal)	<i>Genscript</i>
pHis8	Expression <i>N</i> -terminaler His ₈ -Fusionsproteine	<i>Kan</i> R, His-Tag (<i>N</i> -Terminal)	[¹²²]

III.2.2. Organismen

Tabelle III-2. Verwendete Organismen.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5α	F-ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)	[¹²³]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F-ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3)	Fa. <i>Invitrogen</i>
<i>E. coli</i> SoluBL21	-/-	Fa. <i>Genlantis</i>

III.2.3. Primer

Tabelle III-3. Verwendete Primer.

Name	Sequenz	GC-Gehalt	Schmelzpunkt	Schnittstelle
<i>comH</i> Forward	TTTGGGATCCGTGGCGGCGGTACGGAA	64 %	67.11 °C	BamHI
<i>comH</i> Reverse	ATACCTCGAGTCACGCCGTCTAGCCGG	64 %	67.44 °C	XhoI

Die verwendeten Primer, synthetisiert und als Lyophilisat geliefert von der Fa. *Invitrogen*, wurden in sterilem, dest. Wasser zu einer Konzentration von 100 pmol/ μ L als Vorrat gelöst und bei -20 °C gelagert.

III.3. Medien und Puffer

III.3.1. Nährmedien für die Proteinexpression

Für die Anzucht von *E. coli* Zellen wurden LB- (Luria Bertani/ Miller) und TB- (Terrific-Broth) Medien verwendet. Beide Medien wurden als fertig zusammengesetzte Pulver von der Fa. *Roth* erworben. Zur Herstellung von 1 L LB-Medium wurden laut Gebrauchsanleitung 25 g Medium-Pulver mit dest. Wasser auf 1 L aufgefüllt. Zur Herstellung von 1 L TB-Medium wurden laut Gebrauchsanleitung 47.6 g Medium-Pulver und 4 mL Glycerol mit dest. Wasser auf 1 L aufgefüllt. Mittels Autoklavieren wurden die Medien sterilisiert.

III.3.2. LB-Agar-Kulturplatten

Kulturplatten wurden aus gebrauchsfertig gemischtem LB-Agar-Medium der Fa. *Roth* hergestellt. Hierzu wurden auf 1 L Medium 40 g Medium-Pulver angesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55 °C wurde zur Selektion von resistenten Mutanten das entsprechende Antibiotikum (Endkonzentration = 100 μ g/mL AMP bzw. 50 μ g/mL KAN) hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten sofort ausgegossen.

III.3.3. SOC-Medium (Super Optimal broth with Catabolite repression)

Das SOC-Medium wurde für die Transformation von *comH* in elektrokompetente *E.coli* SoluBL21 Zellen verwendet.

Tabelle III-4. Zusammensetzung des SOC-Mediums.

Bestandteil	Menge
<i>Trypton</i>	20 g
<i>Hefeextrakt</i>	5 g
NaCl	0.58 g
KCl	0.19 g
1 M MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 mL
1 M MgCl ₂ · 6H ₂ O	10 mL
40 % D -Glucose	9 mL
dH ₂ O	auf 1 L

MgSO₄, MgCl und Glucose wurden nach dem Autoklavieren über einen Sterilfilter hinzugegeben.

III.3.4. Puffer für die Proteinaufreinigung

Tabelle III-5. Zusammensetzung des Lysis-Puffers, Waschpuffers und des Elutionspuffers.

Bestandteil	Lysis-Puffer Konzentration	Waschpuffer Konzentration	Elutionspuffer Konzentration
Imidazol	10 mM	80 mM	500 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM
Glycerol	10 %	10 %	10 %
dH ₂ O	auf Endvolumen auffüllen		

III.3.5. Assaypuffer

Tabelle III-6. Zusammensetzung der Assaypuffer.

Tris/ HCl	HEPES 1	HEPES 2	HEPES 3	Kaliumphosphat
50 mM	25 mM	25 mM	50 mM	50 mM
50 mM MgCl ₂	10 mM NaCl	10 mM NaCl	50 mM NaCl	-/-
pH 7.5	pH 8.0	pH 7.0	pH 7.0	pH 7.0
mit dH ₂ O auf Endvolumen auffüllen				

III.3.6. Antibiotika und Zusätze

Ampicillin (AMP) wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/mL eingesetzt. Dazu wurde eine sterilfiltrierte Stocklösung der Konzentration 100 mg/mL gelöst in einem 1:1 Wasser-Ethanol-Gemisch verwendet. Kanamycin (KAN) wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/mL angewendet, wobei eine sterilfiltrierte Stocklösung der Konzentration 50 mg/mL gelöst in dest. Wasser verwendet wurde.

Die Induktion der Proteinproduktion wurde mittels einer sterilfiltrierten, wässrigen 1 M Stocklösung von Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid (IPTG) ausgelöst.

III.4. Mikro- und molekularbiologische Techniken

III.4.1. Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten Bakterien wurden entweder in flüssigem Medium oder auf Kulturplatten kultiviert. Für die flüssige Kultivierung wurde das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum in einer 1:1000-Verdünnung versetzt. Nachdem das Flüssigmedium aus einer bakteriellen Stockkultur oder einer Kulturplatte mittels eines Zahnstochers oder einer Pipettenspitze beimpft wurde, wurde es über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 rpm inkubiert. Die Kultivierung auf Kulturplatten erfolgte durch Animpfung mittels einer Impföse, wenn die Bakterien in Form einer Kryokultur gelagert wurden. Im Fall einer Animpfung aus einer Flüssigkultur wurden 100 µL der frischen Flüssigkultur über Glaskügelchen auf der Kulturplatte verteilt. Anschließend wurde die Platte zur Inkubation bei 37 °C über Nacht in den Inkubationsschrank gelegt.

III.4.2. Stammhaltung in Kryokulturen

Die Lagerung der verwendeten Bakterienstämme erfolgte in Form von Glycerinkulturen bei -78 °C. Hierfür wurden flüssige Bakterienkulturen angezogen. 500 µL dieser Kulturen wurden mit 1000 µL einer sterilen 50 %igen Glycerin-Lösung vermischt, so dass letztlich der Gehalt an Glycerin- und Bakterienkultur in einem 1:1-Verhältnis vorlag. Die Glycerinkulturen wurden in 2 mL-Portionen in Kryoröhrchen abgefüllt und bei -78 °C gelagert.

III.4.3. Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Zur Bestimmung der Zelldichte von Zellkulturen wurde mit Hilfe eines Photometers die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gegen das jeweilige sterile Kulturmedium als Referenz gemessen. Dabei gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz, das wie folgt lautet:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d.$$

Da ε und d Konstanten sind, verhält sich die Konzentration linear proportional zur gemessenen Extinktion.

E = Extinktion

ε = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = optische Weglänge (Dicke der Küvette)

III.4.4. Transformation

Eine Transformation entspricht der Überführung eines Vektors, der ein bestimmtes Gen enthält, in einen Organismus. Hierzu wird die Zellmembran des Organismus entweder chemisch (Hitzeschocktransformation) oder elektrisch (Elektroporationstransformation) durchlässig gemacht, so dass der Vektor hinein diffundieren kann. Die dafür benötigten chemisch- bzw. elektrokompetenten Zellen wurden in der Arbeitsgruppe hergestellt.

Hitzeschocktransformation

Ein Aliquot (100 μ L) chemisch-kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 0.5 μ L eines Plasmids in Wasser versetzt. Die Mischung wurde zur Homogenisierung 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Danach wurde erneut 2 min auf Eis inkubiert und anschließend wurden 500 μ L LB-Medium hinzugegeben. Nachdem die Transformationslösung 1 h bis 2 h bei 37 °C zum Regenerieren und Wachsen der Zellen stehen gelassen wurde, wurden zwei Antibiotikum-haltige LB-Agarplatten beimpft. Eine Agar-Platte wurde mit 100 μ L der Suspension ausplattiert. Die restliche Suspension wurde 2 min bei 9000 rpm zentrifugiert und der Überstand zum größten Teil durch Umkippen des Reaktionsgefäßes verworfen. Mit der restlichen Flüssigkeit des Überstands wurde das Pellet resuspendiert und für die zweite Ausplattierung verwendet. Beide Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Elektroporationstransformation

Ein Aliquot (40 μL) elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 μL eines Plasmids in Wasser versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Mischung in eine gekühlte, sterile Elektroporationsküvette überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellsuspension gleichmäßig im unteren Bereich der Küvette verteilt war. Mittels des Elektroporators wurde das Gemisch über das Programm EC2 Bacteria einer kurzzeitigen Spannung von 2.5 kV ausgesetzt. Dem folgend wurde 1 mL SOC-Medium dazugegeben, das Gemisch in ein steriles 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 37 °C und 200 rpm für 1.5 h inkubiert. Um eine zu dichte Anzucht von Kolonien zu vermeiden, wurde die Transformationsmischung mit einer 1:10-Verdünnung bzw. 1:100-Verdünnung auf zwei Kulturplatten mit Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

III.4.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, DNA selektiv zu amplifizieren. Die Screening-PCR wurde zur Überprüfung verwendet, ob Bakterienkolonien auf Kulturplatten das Insert, *comH*, enthalten. Dabei dienten ganze Zellen als Templat. Hierzu wurden einzelne Kolonien in 10 μL sterilem Reinstwasser resuspendiert. 5 μL dieser Suspension wurden als Beimpfungslösung in 50 μL LB-Medium mit 1 % AMP gelöst und bei 4 °C gelagert. Die restlichen 5 μL wurden in der PCR eingesetzt. Die weitere Zusammensetzung der PCR-Lösung ist in Tabelle III-7 und die PCR-Methode in Tabelle III-8 aufgelistet. Die Beimpfungslösungen von Klonen mit positivem PCR-Ergebnis wurden zur Kultivierung und anschließender Plasmidisolierung verwendet.

Tabelle III-7. Zusammensetzung der Screening-PCR-Lösung.

Bestandteil	Volumen
Taq-Puffer (10 x)	2.5 μL
Taq-Polymerase (2.5 U/μL)	0.125 μL
DMSO (100 %)	1 μL
dNTPS (10 mM)	0.25 μL
Primer <i>comH</i> Forward (20 pmol/μL)	0.125 μL
Primer <i>comH</i> Reverse (20 pmol/μL)	0.125 μL
DNA Template	5 μL
rH₂O	15.875 μL

Tabelle III-8. Bedingungen der Screening-PCR.

Segment	Temperatur	Zeit
Anfangstemperatur	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	50 s
Primerhybridisierung	64 °C	30 s
Elongation	72 °C	1.5 min (1 min/kb)
Abschließende Elongation	72 °C	5 min

} x 30

III.4.6. Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung wurde das peqGOLD Plasmid Miniprepkit I der Fa. *Peqlab* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem vom Hersteller angegebenen Kurzprotokoll. Hierfür wurden zunächst 5 mL Übernachtskulturen mit Kolonien, die zuvor mittels einer Screening-PCR auf enthaltenes Insert untersucht wurden, angesetzt. Anschließend wurden 1 bis 3 mL einer Übernachtskultur zentrifugiert (10 min, 5000 x g). Das Pellet wurde in 250 µL Lösung I (RNaseA) durch Vortexen resuspendiert und mit 250 µL Lösung II versetzt. Nachdem die Suspension durch Invertieren gemischt wurde, wurden 350 µL Lösung III zugegeben und erneut invertiert. Die Mischung wurde danach zentrifugiert (10 min, 10000 x g) und mit dem Überstand (in max. 750 µL-Schritten) wurde eine Perfect Bind DNA Column beladen. Dabei wurde die DNA an eine Silikamembran gebunden. Durch Zentrifugation (1 min, 10000 x g) wurde die Lösung entfernt. Das an die Membran der Säule gebundene Plasmid wurde durch Waschen mit speziellen Puffern aufgereinigt (1 Mal mit 500 µL PW Plasmid Buffer, 2 Mal mit 750 µL DNA Wash Buffer, jeweils 1 min bei 10000 x g zentrifugiert). Anschließend wurde die Membran 2 min bei 10000 x g trocken zentrifugiert und mit 50 µL reinstem Wasser in ein neues, steriles Reaktionsgefäß eluiert (Zentrifugation: 1 min bei 5000 x g).

III.4.7. Restriktion (Testverdau)

Zur Kontrolle der Plasmidisolierung von *comH* (ca. 1500 kb) wurden Test-Restriktionen durchgeführt. Die Restriktionsansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Tabelle III-9. Reaktionsansatz für einen Testvedau.

Bestandteil	Volumen
Vektor	1 μL
<i>Bam</i> HI	0.5 μL
<i>Xho</i> I	0.5 μL
Puffer (NEB 3)	1 μL
BSA (10 x)	1 μL
rH ₂ O (auf 10 μL)	6 μL

III.5. Proteinexpression und Proteinreinigung

III.5.1. Proteinexpression - *ComH*

Jede ComH-Expression wurde mit frisch transformierten *E. coli* BL21 (DE3) bzw. *E. coli* SoluBL21-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden Übernachtskulturen mit Kolonien aus Transformations-Agar-Kulturplatten in LB-Medium mit AMP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Endkonzentration) bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden Hauptkulturen angeimpft. Hierzu wurde TB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMP und 1 % (v/v) Vorkultur versetzt (1 L-Kulturen wurden in 2 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit Schaumstoffstopfen angesetzt). Es folgte die Anzucht der Zellen bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von ungefähr 0.6 bis 0.8. Anschließend wurden die Kulturen in 20 min auf 4 bis 0 °C gekühlt und mit 1 M IPTG (1 mM Endkonzentration) wurde die Proteinexpression induziert. Nach einer Inkubation bei 16 °C und 200 rpm für 15 bis 18 h wurde die Kultur pelletiert (6000 x g, 3 min oder 5000 x g, 5min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder sofort weiterbehandelt oder bis zur Aufreinigung bei -78 °C gelagert.

III.5.2. Proteinexpression - *SsuE*

Vorkulturen für die SsuE-Expression wurden aus einer flüssigen Stockkultur, welche bei -78 °C gelagert wurde, in LB-Medium mit KAN (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Endkonzentration) angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden Hauptkulturen angeimpft. Hierzu wurde TB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KAN und 1 % (v/v) Vorkultur versetzt (1 L-Kulturen wurden in 2 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit Schaumstoffstopfen angesetzt). Es folgte die Anzucht der

Zellen bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von ungefähr 0.6 bis 0.8. Anschließend wurden die Kulturen innerhalb von 20 min auf 4 bis 0 °C gekühlt und mit 1 M IPTG (0.2 mM Endkonzentration) wurde die Proteinexpression induziert. Nach einer Inkubation bei 16 °C und 200 rpm für 15 bis 18 h wurde die Kultur pelletiert (6000 x g, 3 min oder 5000 x g, 5min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder sofort weiterbehandelt oder bis zur Aufreinigung bei -78 °C gelagert.

III.5.3. Zellaufschluss

Für die Isolierung der überexprimierten Proteine wurden die Zellpellets in Lysispuffer resuspendiert (pro 1 g Pellet 4 mL Lysispuffer). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Proteine stets unter Kühlung (Eis, Kühlschrank, Gefrierschrank) bearbeitet und gelagert wurden. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung. Hierzu wurde jede 20 mL Pelletresuspension 8 Mal für 10 s unter Eis-Kühlung beschallt, wobei zwischen jeder Wiederholung eine Pause von 10 s eingelegt wurde. Danach folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 10000 rpm für 15 bis 30 min, um die löslichen Bestandteile der Proben von den unlöslichen zu trennen.

Für die Analytik wurden 100 µL der lysierten Probe entnommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 220 µL rH₂O verdünnt und das Pellet in 280 µL rH₂O resuspendiert. Je 20 µL wurden für die SDS-PAGE aufgehoben.

III.5.4. Proteinreinigung

Über Nickel-Affinitätschromatographie wurden die His-Tag-fusionierten Proteine gereinigt. Zunächst wurde zu dem zellfreien Lysat Ni-NTA-Agarose gegeben und anschließend auf Eis für 2 bis 3 h durch Schwenken inkubiert. Für die Reinigung von ComH wurden 0.75 mL Ni-NTA-Agarose pro 1 L Kultur und für die Reinigung von SsuE 2 mL Ni-NTA-Agarose pro 1 L Kultur eingesetzt. Die Mischung aus Lysat und Ni-NTA-Agarose wurde auf eine Säule gegeben, die das Harz zurückhielt und die Flüssigkeit durchließ. Das Protein-bindende Harz wurde mit Waschpuffern unterschiedlicher Imidazolkonzentration gewaschen. Zum Schluss wurde das Protein mit einem Elutionspuffer mit hohem Imidazolgehalt von der Ni-NTA-Agarose eluiert (die Ni-NTA-Agarose wurde regeneriert).

Tabelle III-10. Wasch- und Elutionschritte für die Proteinreinigung.

Protein	Waschpuffer	Elutionspuffer zum Waschen	Elutionspuffer zum Eluieren	Elutionsschritte
ComH	10 mL	-/-	3 x 2.5 mL	1.) 0.7 mL + 3 x 0.6 mL 2.) 0.5 mL + 2 x 1 mL 3.) 0.5 mL + 2 x 1 mL
SsuE	10 mL	1 mL	3 x 2.5 mL	1.) 0.7 mL + 3 x 0.6 mL 2.) 0.5 mL + 2 x 1 mL 3.) 0.5 mL + 2 x 1 mL

Um möglichst alle Proteinmoleküle von der Ni-NTA-Agarose zu lösen, wurde die Elution drei Mal durchgeführt. Das Elutionsvolumen wurde in drei Portionen aufgeteilt. Im Fall von SsuE wurde jede Elutionsportion vor dem Auffangen jeweils 10 min auf Eis inkubiert, da SsuE besonders fest an Ni-NTA zu binden scheint und das Ablösen länger dauerte. Für die SDS-PAGE-Analyse wurden von dem Durchlauf und allen Wasch- und Elutionsschritten 20 µL-Proben entnommen.

III.5.5. Entsalzung und Aufkonzentrierung der Proteine

Für die Entfernung des Imidazols aus Protein-Lösungen wurde die Entsalzungsmethode mittels einer PD-10-Säule der Fa. *GE Healthcare* angewendet. Hierzu wurde die Säule vor der Entsalzung mit dem entsprechenden Assaypuffer gereinigt und gesättigt. Maximal 2.5 mL zu entsalzende Protein-Lösung wurde aufgetragen. Nachdem diese vollständig in die PD-10-Säule eingezogen war, wurde das Protein mit 3.5 mL Assaypuffer eluiert. Es hat sich herausgestellt, dass SsuE länger auf der PD-10-Säule verbleibt und erst nach 4 mL Vorlauf von der Säule eluiert und 4 mL Elutionsvolumen benötigt. Die anschließende Aufkonzentration erfolgte mit Hilfe von Vivaspin Zentrifugationskonzentratoren der Fa. *Sartorius Stedim Biotech*, welche durch eine semipermeable Membran über Molekulargewichtsausschlussgrößen (MWCO, engl.: molecular weight cut-off) die Proben konzentrieren können. Dabei war darauf zu achten, dass die MWCO des Vivaspin Konzentratoren maximal halb so groß war, wie die Größe des aufzukonzentrierenden Proteins. Dementsprechend wurde für ComH (83.155 kDa) ein Viaspin Konzentrator der Größe mit 30000 MWCO und für SsuE (23.555 kDa) der Größe mit 10000 MWCO verwendet.

III.5.6. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde entweder mittels des Nanophotometers der Fa. *Implen* und errechneter Extinktionsfaktoren der Proteine, oder über den Bradford-Test ermittelt. Mit Hilfe des Roti®-Nanoquant 5 x-Konzentrats der Fa. *Roth* wurde dem Herstellerprotokoll entsprechend eine Eichgerade mit BSA als Standardprotein und rH₂O als Referenz erstellt. Dabei wurde der Quotient der Absorption bei 590 nm zu der Absorption bei 450 nm gegen die BSA-Konzentration aufgetragen. Für die Absorptionsmessung der Proteine wurden Proben verschiedener Proteinmengen vorbereitet, indem 2 µL, 5 µL und 10 µL Proteinlösung jeweils auf 200 µL mit rH₂O aufgefüllt und mit 800 µL Arbeitslösung gemischt wurden. Anschließend wurde mit dem Nanophotometer die Absorption bei 590 und 450 nm gemessen, wobei das Nanophotometer direkt den Quotienten angegeben hat. Sowohl für die Erstellung der Eichgerade als auch für die Konzentrationsbestimmung wurde für jede Messung drei Mal durchgeführt und der Mittelwert errechnet.

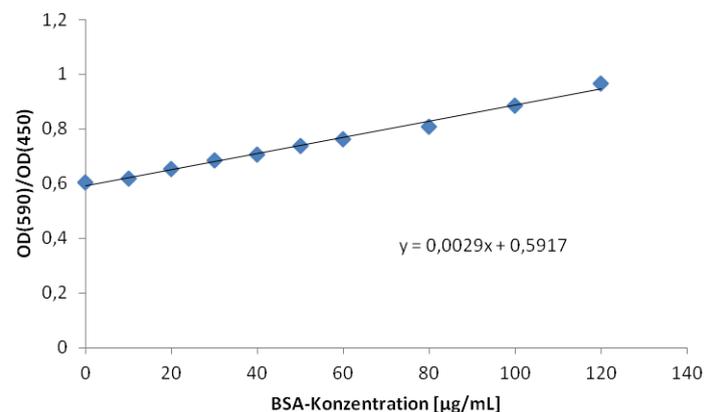


Abbildung III-1. Beispielhafte Eichgerade zur Proteinkonzentrationsbestimmung.

III.6. Gelelektrophorese

III.6.1. Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 1 %ige Agarose-Gele verwendet, um die Größe der Plasmid-Fragmente (vgl. Kapitel III.4.7) zu überprüfen. Für die Herstellung eines Agarose-Gels wurde Agarose in TAE-Puffer (1 x) (verdünnt aus einer 10 x Lösung der Fa. *Roth*) durch Erhitzen (Mikrowelle) gelöst und nach Abkühlen auf ca. 70 °C in einen Gelträger überführt, wo die Lösung mit einem Taschenkamm versehen wurde und zum Gel aushärten konnte. Nach dem Aushärten wurde der Gelträger in eine Elektrophoresekammer plziert. Als flüssige Phase diente TAE-Puffer (1 x). Die aufzutragenden Proben wurden entweder mit dem Gel Loading Buffer of DNA Stain (blue > 500 bp, orange < 500 bp) der Fa. *Jena Bioscience* (8 µL PCR-Probe mit 2 µL Ladepuffer) oder mit einem 10 x Ladepuffer (0.15 % OrangeG, 0.05 % Xylencyanol, 0.05 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose) versetzt. Der GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (3 µL) der Fa. *Thermo Scientific* wurde als Referenz zur Größenbestimmung der Plasmid-Fragmente eingesetzt. Nach der Probenauftragung wurde eine elektrische Spannung von 90 V angelegt, damit die negativ geladenen Fragmente von der Anode zur Kathode wandern konnten. Dabei diffundieren kleinere Fragmente schneller als größere, womit eine Trennung der Fragmente nach ihrer Größe gewährleistet wird. Die Analyse und Dokumentation des Agarose-Gels erfolgte nach einer 20-minütigen Anfärbung in einer verdünnten ClearG-Lösung.

Tabelle III-11. Zusammensetzung des 1 %igen Agarose-Gels.

Bestandteil	Menge
Agarose	300 mg
TAE-Puffer (1 x)	30 mL

III.6.2. SDS-Gelelektrophorese

Die Analyse von exprimierten und isolierten Proteinen erfolgte mit Hilfe von SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese, engl.: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis). Dadurch, dass Natriumdodecylsulfat die Eigenladung der Proteine überdeckt, sind alle Moleküle gleichermaßen negativ geladen und es findet eine Trennung der aufgetragenen Proteine ausschließlich nach der Molekülmasse statt. Hierbei wandern kleinere Proteine im angelegten Strom (90 V) schneller.

Es wurde ein System aus zwei Gelen angewendet. In das Sammelgel (4 %) wurden die vorbereiteten Proteinproben (9 μL) in die mittels eines Probenkammes eingeführte Taschen aufgetragen. Das Sammelgel dient zur Fixierung und Konzentration der Proben. Im Trenngel erfolgt die unterschiedlich schnelle Migration der Proteine. Die Proben wurden vor der Auftragung mit einem SDS-Ladepuffer (5 x) versetzt (20 μL Probe und 5 μL Puffer) und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nachdem die Proben kurz zentrifugiert wurden, wurden sie auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Referenz wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker (*Thermo Scientific*) und im Fall von ComH zusätzlich peqGOLD Protein Marker VII (*Peqlab*) benutzt. Das Laufmittel bestand aus einer 1 x Lösung von SDS-Puffer (verdünnt aus einer 10 x Lösung der Fa. *Roth*). Mittels Quick Coomassie Stain (*Generon, Serva*) bzw. Roti Blue 5 x (*Roth*) wurde das Gel nach der Elektrophorese für 15 bis 18 h angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Nach anschließender Entfärbung mit einer Wasser-Methanol-Waschlösung (25 % MeOH) wurde das Gel dokumentiert.

Tabelle III-12. Zusammensetzung des Sammelgels (angegebene Menge reicht für zwei Gele).

Bestandteil	Volumen
H ₂ O	3.25 mL
Sammelgel-Puffer (Tris/ HCl, 0.5 M; SDS, 0.8 % (w/v); pH 6.8)	1.25 mL
Acrylamid (40 %)	0.5 mL
APS (10 %, w/v)	50 μL
TEMED	5 μL

Tabelle III-13. Zusammensetzung eines 12 %igen Trenngels (angegebene Menge reicht für zwei Gele).

Bestandteil	Volumen
H ₂ O	6.75 mL
Trenngel-Puffer (Tris/ HCl, 1.5 M; SDS, 0.8 % (w/v); pH 8.8)	3.75 mL
Acrylamid (40 %)	4.5 mL
APS (10 %, w/v)	0.15 mL
TEMED	15 μL

Bei der Herstellung der Gele wurde der Radikalbeschleuniger TEMED zuletzt zugegeben, damit die Polymerisation nicht bereits während der Herstellung des Gels startet, und die Mischung beim Gießen in die Glaskammern flüssig bleibt.

Tabelle III-14. Zusammensetzung des SDS-Ladepuffers 5 x.

Bestandteil	Menge
Tris/HCl, pH 6.8	220 mM
β -Mercaptoethanol	5 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
Bromophenolblau	0.2 % (w/v)
Glycerol	50 % (v/v)

III.7. Enzymatische Assays

III.7.1. PCP-Ladeassay

Für die Beladung der PCP-Domänen mit Substrat (0.5 bis 1 mM) wurde die PCP-Domäne (0.04 μ L/mL) zuerst mit Sfp (6.17 μ M) und CoA (200 μ M) in Kaliumphosphatpuffer (KPP, 50 mM, pH 7.5) bzw. Tris/HCl-Puffer (50 mM, mit $MgCl_2$ 50 mM, pH 7.5) versetzt und 1 h bei 37 °C bei 200 bis 1300 rpm geschüttelt. Dabei wurde bei der Reihenfolge der Zugabe darauf geachtet, dass die PCP-Domäne vor dem Sfp im Puffer gelöst wurde, da sich sonst ein weißer Niederschlag bildete. CoA wurde zum Schluss zugegeben. Dem folgend wurde zu dieser Mischung das zu ladende Substrat, gelöst in ACN, zugefügt und 1 bis 2 h bei 28 °C und 200 bis 1300 rpm geschüttelt. Insgesamt bestand das Assay-Lösungsmittel zu 50 % aus ACN und zu 50 % aus Puffer.

Da es nicht möglich war, mit Hilfe der uns zur Verfügung stehenden Geräte die Konzentration der PCP-Domäne, wahrscheinlich aufgrund der zu kleinen Protein-Größe, sicher zu bestimmen, wurde willkürlich ein Volumen gewählt, das sich während der Untersuchungen bewährt hat.

Fortgang ohne anschließenden Kupplungsassay:

Anschließend wurde für 10 min bei 14000 rpm und 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet getrennt und auf Eis stehen gelassen bis eine Phasentrennung zwischen ACN und dem Puffer stattfand, sodass die organische Phase entfernt werden konnte. Die wässrige Phase wurde so lange mit ACN gewaschen bis auch bei längerem Stehenlassen sich die Phasen nicht mehr getrennt haben (maximal zwei Mal). Die wässrige Phase wurde mittels LC-MS mit einem Injektionsvolumen von 80 bis 90 μ L analysiert.

Fortgang mit anschließenden Kupplungsassay:

Anschließend wurde die Mischung auf Eis stehen gelassen bis eine Phasentrennung zwischen ACN und dem Puffer stattfand, sodass die organische Phase entfernt werden konnte. Die wässrige Phase wurde so lange mit ACN gewaschen bis sich die Phasen auch bei längerem Stehenlassen nicht mehr trennten (maximal zwei Mal). Überschüssiges ACN wurde unter Argon-Strom verdampft und der Rückstand mit KPP auf 100 μ L aufgefüllt. Diese Lösung wurde für den Kupplungsassay verwendet.

III.7.2. Biaryl-Kupplungsassay

Zu der Mischung aus dem PCP-Assay wurden die oxidativen Cytochrom-P450-Enzyme ComI und ComJ (je 8 μ M Endkonzentration) separat bzw. zusammen, NADPH in Wasser gelöst (1 mM Endkonzentration), PetF (20 μ M Endkonzentration), FprDH5 α (10 μ M Endkonzentration), Gdh-BM3 (20 μ M Endkonzentration) und steril filtrierte Glukose (1 mM Endkonzentration) gegeben. Dabei stellen Glukose und Gdh-BM3 ein regeneratives System zur Aufrechterhaltung des Elektronenspiegels dar. Mit KPP wurde die Assay-Lösung zum Endvolumen aufgefüllt und für 1 h bei 30 °C und 13000 rpm geschüttelt. Für eine bessere HPLC-MS-Analyse wurde das Peptid anschließend von der PCP-Domäne gespalten, indem eine 25 %ige Hydrazin-Lösung (1/10 des Assay-Volumens) hinzugegeben und weitere 30 min bei 30 °C und 1300 rpm geschüttelt wurde. Nachdem 10 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert wurde, folgte die Aufreinigung mittels Festphasenextraktion. Hierzu wurden StrataTM-X Säulen (High Performance Polymeric, 200 mg/3 mL, RP, 33 μ) der Fa. *Phenomenex* mit folgender Methode verwendet.

Methode der Festphasenextraktion für die Aufreinigung der Kupplungsassays:

1. Konditionierung mit 1 mL MeOH.
2. Equilibrierung mit 1 mL H₂O.
3. Laden der Probe.
4. Waschen mit 1 mL 5 % ACN in H₂O (aufgeteilt in 2 x 0.5 mL).
5. Erstes Eluieren mit 1 mL 20 % ACN in H₂O + 2 % Ameisensäure (aufgeteilt in 2 x 0.5 mL).
6. Zweites Eluieren mit 1 mL ACN + 2 % Ameisensäure (aufgeteilt in 2 x 0.5 mL).

Die Methode wurde dem Verhalten des Substrates bzgl. der HPLC-Methode entsprechend entwickelt und es wurden HPLC-grade Lösungsmittel benutzt.

III.7.3. Aktivitätstests zu ComH und SsuE

Für die Überprüfung der Aktivität der überproduzierten und aufgereinigten Enzyme, ComH und SsuE, wurden UV-Vis-Spektren (200 bis 700 nm) von verschiedenen Reaktionsansätzen über eine Zeitspanne von 5 min bei RT mittels des Nanophotometers der Fa. *Implen* aufgenommen, um den Verbrauch von NADPH und FAD zu detektieren. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

1) Test zum Verbrauch von NADPH und FAD bei Anwesenheit von SsuE:

FAD (20 μ M), SsuE (10 μ M), NADPH (1 mM) in HEPES-Puffer (25 mM, mit NaCl 10 mM, pH 8.0 bzw. pH 7.0).

2) Test zum Verbrauch von NADPH und FAD bei Abwesenheit von SsuE (= Negativkontrolle):

FAD (20 μ M), NADPH (1 mM) in HEPES-Puffer (25 mM, mit NaCl 10 mM, pH 8.0 bzw. pH 7.0).

3) Test zum Verbrauch von FAD bei Anwesenheit von SsuE ohne Zugabe von NADPH (= Negativkontrolle):

FAD (20 μ M), SsuE (10 μ M) in HEPES-Puffer (25 mM, mit NaCl 10 mM, pH 8.0 bzw. pH 7.0).

4) Test zum Verbrauch von NADPH und FAD bei Anwesenheit von SsuE und ComH, ohne Zugabe von FAD:

ComH (20 μ M), SsuE (10 μ M), NADPH (1 mM) in HEPES-Puffer (25 mM, mit NaCl 10 mM, pH 8.0 bzw. pH 7.0).

III.7.4. Halogenierungsassay

III.7.4.1. Halogenierungsassay mit isolierten Enzymen

Der Assay-Ansatz bestand aus Substrat (0.5 mM bzw. 1mg/540 μ L), FAD (10 μ M gelöst in rH₂O), ComH (25 μ M), SsuE (25 μ M), NADPH (2,5 mM, gelöst in rH₂O) in HEPES-Puffer (25 mM, mit NaCl 10 mM, pH 8.0 bzw. pH 7.0). Die Mischung wurde für 1 h bei 30 °C, 300 rpm inkubiert. Dabei wurden die Substrate wie folgt gelöst: L-Tyr (**43**) in rH₂O mit 4.0 % 2.5 N NaOH(aq), HPPA (**44**) in rH₂O mit 3.8 % DMSO, HMA (**45**) und Ketosäure **46** jeweils in rH₂O, L-HPG (**L-47**) in rH₂O mit 10.0 % 2.5 N NaOH(aq), SNAc-L-Tyr (**147**) in rH₂O mit 5.8 % DMSO, SNAc-Ketosäure **150** in rH₂O mit 19.0 % DMSO. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte auf verschiedenen Wegen. Da noch keine perfekt geeignete

Methode ermittelt wurde, werden im Folgenden die getesteten Aufarbeitungsmethoden beschrieben:

- 1) Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μL TFA beendet. Nachdem die dadurch ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT) und von dem Überstand getrennt wurden, wurde der Überstand für die HPLC-MS-Analyse verwendet.
- 2) Nach der Inkubation bei 30 °C wurde der Assay-Ansatz zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT). Um die Proteine vollständig aus der Lösung zu entfernen, wurden Zentrifugal-Filter der Fa. VWR genutzt. Hierzu wurde der Überstand aus der ersten Zentrifugation über den Zentrifugal-Filter nochmals zentrifugiert (30 min 10000 rcf, RT). Der Durchlauf wurde im 1:1-Verhältnis (100 μL HCl/MeOH auf 100 μL Durchlauf) mit einer 1.25 M HCl in Methanol Lösung versetzt und bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Dadurch sollten die Substrate und Produkte in ihre Methylester-Form überführt werden, um eine GC-MS-Analyse durchführen zu können.
- 3) Wie 2) Hierbei wurde jedoch der Durchlauf der Zentrifugation mittels des Zentrifugal-Filters vor der Derivatisierung zum Methylester über Lyophilisation getrocknet. Die Rückstände mit einem Gewicht von 6 bis 12 mg wurden für eine GC-MS-Analyse je mit 500 μL der HCl/MeOH-Lösung versetzt und bei 37 °C, 200rpm inkubiert, bzw. für eine HPLC-Analyse in Wasser (HPLC-grade) gelöst.

III.7.4.2. Halogenierung durch Fütterungsexperimente

Parallel zu den Halogenierungsassays mit isolierten Enzymen wurden Assays mit ComH direkt nach dem Zellaufschluss, ohne weitere Aufarbeitung des Zellüberstandes, durchgeführt. Hierzu wurden L-Tyrosin (**43**) oder die Ketosäure **46** als mögliche Substrate eingesetzt. Da der Zellüberstand alle benötigten Bestandteile enthalten sollte, wurde lediglich das Substrat zugesetzt und bei 30 °C und 300 rpm 4 h bzw. über Nacht inkubiert. Trotz der Annahme, dass der Zellüberstand alle Bestandteile beinhaltet, wurde zur Sicherheit ein Versuch auch mit Zugabe der Co-Faktoren NADPH und FAD durchgeführt. Dennoch unterschieden sich die Ergebnisse nicht von denen der Assays mit isolierten Enzymen.

Da L-Tyrosin (**43**) kommerziell erhältlich ist, wurde es genutzt, um die Experimente in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (170 und 500 mg pro angesetzte 50 mL-Kultur) zu testen. Die Ketosäure **46** konnte nur in kleinen Mengen produziert werden, da die Herstellung mit einer geringen Ausbeute verbunden war. Deshalb wurde das Fütterungsexperiment mit **46** nur mit 170 mg

durchgeführt. Die Versuche wurden jeweils mit 50 mL-Kulturen unternommen. Nach einer Überproduktion von ComH über Nacht bei 16 °C, 200 rpm wurden die Substrate hinzugefügt und im Anschluss wurden die Ansätze halbiert, und bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (16 und 28 °C) weiter inkubiert. Dabei erfolgte die Inkubation bei beiden Temperaturen über Nacht. Nach dem Pelletieren und dem folgenden Zellaufschluss durch Ultraschall-Einwirkung wurden sowohl das Lysat des Zellaufschlusses als auch der Überstand, welcher nach dem Pelletieren zurückblieb, mittels HPLC analysiert. Bei der angewendeten HPLC-Methode überlappen sich die Signale allerdings stark bzw. liegen sehr dicht beieinander. Da leider kein eindeutiges Signal im Bereich der Retentionszeit der putativen Produkte entstand und eine LC-MS-Analyse mit den gegebenen Substraten oder Produkten nicht möglich war, fällt eine eindeutige Aussage über den Erfolg dieser Versuche schwer.

III.8. Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Die für die Dünnschichtchromatographie verwendeten DC-Aluminiumfolien (DC Kieselgel 60 F₂₄) stammen von der Firma *Merck*. Aufgetragene Substanzen wurden unter einer UV-Lampe bei 254 nm betrachtet. Bei UV-inaktiven Substanzen wurde die DC-Platte mit einer 0,36 %igen Ninhydrin-Lösung in Ethanol, dem Seebach-Reagenz (2.50 g Molybdätophosphorsäure, 5.00 g Cer(IV)sulfat tetrahydrat, 16 mL konz. Schwefelsäure, 450 mL Wasser) oder einer Anisaldehyd-Lösung (3.7 mL *p*-Anisaldehyd, 1.5 mL Eisessig, 5 mL konz. Schwefelsäure, 135 mL Ethanol) angefärbt und bei 250 °C im Heißluftstrom entwickelt.

Säulenchromatographie: Als stationäre Phase wurde für die Säulenchromatographie Silicagel 60 Geduran® Si 60 (40 - 60 µm) der Firma *Merck* verwendet.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Für die HPLC-Analyse von Proben wurden computergesteuerte *Jasco* Systeme verwendet (System1: MD-2010 Plus Multiwavelength Detector, DG-2080-53 3-Line Degaser, zwei PU-2086 Plus Intelligent Prep. Pumps, AS-2055 Plus Intelligent Sampler, MIKA 1000 Dynamic Mixing Chamber, 1000 µL *Portmann Instruments AG* Biel-Benken, LC-NetII/ ADC; System2: UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, DG-2080-53 3-Line Degaser, zwei PU-1580 Intelligent HPLC Pumps, AS-1550 Intelligent Sampler, HG-1580-32 Dynamic Mixer, LC-NetII/ ADC). Die Auswertung erfolgte mittels ChromPass Chromatography Data System-Software bzw. Galaxie-Chromatography-Software jeweils von der Firma *Jasco*. Es wurde eine Eurospher II 100-3 C18 A

(150 x 4.6 mm) Säule mit integrierter Vorsäule der Fa. *Knauer* eingesetzt. Als Laufmittel dienten A = Wasser + 0.05 % TFA und B = Acetonitril + 0.05 % TFA. Die entwickelte Methode bestand aus folgendem Gradienten: von 0-2 min 5 % B, 2-25 min 95 % B, 25-30 min 95 % B, 30-31 min 5 % B, 31-38 min 5 % B bei einem Fluss von 1 mL/min. Wenn nicht ausdrücklich ein anderer Gradient erwähnt wird, wurde die Analyse nach dieser Methode durchgeführt.

Produkt-Isolierungen über semi-präparative HPLC-Trennung wurden an einem PC-gesteuerten *Jasco* HPLC-System durchgeführt, das sich wie folgt zusammensetzte: UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, zwei PU-1580 Intelligent HPLC Pumps, MIKA 1000 Dynamic Mixing Chamber, 1000 µL *Portmann Instruments AG* Biel-Benken, LC-NetII/ ADC, *Rheodyne* Injektionsventil. Die Programmsteuerung wurde mittels *Galaxie*-Software durchgeführt. Das Lösungsmittelsystem bestand aus A = Wasser + 0.05 % TFA und B = Acetonitril + 0.05 % TFA. Die angewendeten Gradienten und Säulen sind in den entsprechenden Versuchsvorschriften notiert.

Nach der präparativen Produkt-Isolierung wurden die entsprechenden Fraktionen kombiniert und unter vermindertem Druck vom Acetonitril befreit. Die wässrigen Phasen wurden anschließend entweder mittels Lyophilisation getrocknet oder in Ethylacetat extrahiert. Die organischen produkthaltigen Lösungen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

HPLC-MS-Kopplung: HPLC-HRMS-Untersuchungen wurden an der Universität Bonn von den Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektroskopie am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* unter der Leitung von Frau Dr. Engeser an einem *microQ-TOF* Flugzeitspektrometer (*Bruker Daltonik*) mit *Apollo-ESI*-Quelle gekoppelt mit einer *Agilent-1200*-HPLC-Anlage mit einer Messgenauigkeit von 5 ppm durchgeführt. Die Steuerung des Systems erfolgte über *HyStar* (*Bruker*) und die Messergebnisse wurden mittels *Data Analysis* der Fa. *Bruker* ausgewertet. Die verwendeten HPLC-Methoden und Säulen sind, falls in der Synthesevorschrift nicht anders erwähnt, identisch mit denen aus der analytischen HPLC. An der *TUM* wurden für die HPLC-MS-Analyse die unter dem Kapitel *HPLC* und *MS* aufgelisteten analytischen HPLC-Systeme mit dem MS-System gekoppelt. Die verwendeten HPLC-Methoden und Säulen sind, falls in der Synthesevorschrift nicht anders erwähnt, identisch mit denen aus der analytischen HPLC.

Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC): Die Reveleris® X2 MPLC-Anlage stammte von der Fa. Grace. Es wurden Reveleris® Silica oder Reverse Phase (RP) C18 Fertigsäulen (Grace) unterschiedlicher Größen je nach Bedarf benutzt. Das System wurde mittels Reveleris® Navigator™ Software der Fa. Grace gesteuert, wobei die UV-Detektion bei 220 nm, 254 nm und 280 nm erfolgte. Die verwendeten Säulengrößen, Lösungsmittelsysteme und Gradienten sind in den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

III.9. Chemikalien

Lösungsmittel: Für die HPLC- und MS-Untersuchungen wurden HPLC-grade und HPLC-MS-grade Acetonitril von Fisher Scientific Deutschland und VWR und HPLC-grade Methanol von VWR verwendet. Das HPLC-Wasser wurde über ein TKA GenPure Wasseraufbereitungssystem gereinigt und entionisiert. Als Puffer wurde Trifluoressigsäure (TFA, für Peptidsynthese) der Fa. Carl Roth benutzt. Für die Säulenchromatographie wurden Dichlormethan, Methanol, Cyclohexan, Pentan, Ethylacetat und Aceton über Destillation gereinigt. Für die Synthesen wurden reine, zur Peptidsynthese und falls nötig trockene Lösungsmittel von Sigma Aldrich, Fisher Scientific, VWR, Acros Organics und Carl Roth gekauft.

Sonstige Chemikalien: Soweit nichts anderes angegeben wurde, wurden alle Reagenzien von Sigma Aldrich, Carbolution, VWR, Acros Organics und Carl Roth bezogen.

III.10. Allgemeine Arbeitsvorschriften

Sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden unter Schlenk-Technik mit Argon als Schutzgas ausgeführt. Hierzu wurden eingesetzte Schlenkkolben mehrmals unter Vakuum ausgeheizt und mit Argon geflutet.

III.11. Allgemeine Arbeitsvorschriften für die SPPS

Aufschwellen des Harzes

Um einen guten Kontakt zwischen dem am Harz gebundenen Linker und der ersten Aminosäure bzw. zwischen der wachsenden Peptidkette am Harz und den weiteren Reaktanden zu ermöglichen, wurde das Harz vor jedem Schritt aufgeschwollen. Hierfür wurde der Reaktor mit dem Harz mit trockenem DCM gefüllt und für 20 bis 30 min durch Schütteln inkubiert. Anschließend wurde DCM durch Filtrieren entfernt. Falls nötig wurde das Harz zusätzlich im Vakuum getrocknet.

Waschen des Harzes

Nach jeder Reaktion wurde das Harz gewaschen, indem der Reaktor mit Harz zunächst drei Mal mit absolutem DMF gefüllt, 10 s geschüttelt und das Lösungsmittel durch Filtrieren entfernt wurde. Anschließend wurde der Reaktor mit abs. MeOH gefüllt und 10 s geschüttelt. In MeOH zieht sich das Harz zusammen, so dass überschüssige Reaktanden, die sich in den Poren des Harzes verfangen, leichter entweichen können. Nachdem MeOH abfiltriert wurde, wurde der Reaktor abwechselnd mit abs. DCM und DMF gefüllt, 10 s geschüttelt und das Lösungsmittel abfiltriert. Der letzte Waschvorgang erfolgte drei Mal mit DCM, damit das folgende Trocknen unter Vakuum schneller verlief.

Aktivieren des 2-Chlortrityl-Harzes

Für die Festphasen-Peptidsynthese wurde das 2-Chlortritylchlorid-Harz verwendet. Vor dem Beladen des Harzes mit der ersten Aminosäure wurde es unter Argon-Atmosphäre aktiviert. Dafür wurde es zunächst jeweils drei Mal mit trockenem DMF (10 mL/g Harz) und DCM (10 mL/g Harz) in einem Glas-Reaktor mit Hahn und Fritte gewaschen. Anschließend wurden 1.5 eq frisch dest. Thionylchlorid in trockenem DCM (10 mL/g Harz) zugegeben, wobei sich die gold-gelben Harzkügelchen dunkel-braun färbten. Es wurde 1 h bei RT geschüttelt und danach filtriert. Nach dem Waschen mit trockenem DMF (2 x 10 mL/g Harz) und trockenem DCM (3 x 10 mL/g Harz) erhielt das Harz wieder die ursprüngliche Farbe.

Laden der ersten Aminosäure

3 eq der zu ladenden *N*-Fmoc-geschützten Aminosäure und 3.2 eq NMM wurden in so viel Lösungsmittel, wie der Reaktor aufnimmt (maximal 15 mL/mmol) gelöst. Das Lösungsmittel setzte sich aus abs. DCM und DMF in einem 10 : 1 Verhältnis zusammen. Der Reaktor mit dem Harz und der Reaktionslösung wurde bei RT 16 bis 24 h geschüttelt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde filtriert, der Reaktor mit abs. MeOH gefüllt und für 10 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert und gewaschen. Dem folgte das „Cappen“ der noch freien Bindungsstellen des Harzes. Hierfür wurde der Reaktor mit dem Harz mit DCM/MeOH/DIPEA in einem Verhältnis von 80 : 15 : 5 gefüllt und

15 min bei RT geschüttelt. Nachdem das Harz filtriert, gewaschen und getrocknet wurde, wurde die Konzentration an geladener Aminosäure mit Hilfe des Fmoc-Tests ermittelt.

Bei der Beladung mit *N*-Alloc-D-4-HPG wurde der Beladungsgehalt über die abgewogene Masse des Harzes nach der Reaktion und nach gründlichem Trocknen berechnet.

Fmoc-Entschützung

Für die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz mit 2.1 eq Piperidin (20 % in DMF) behandelt und 2 bis 24 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde filtriert, gewaschen und mittels des Fmoc-Tests bzw. des Kaiser-Tests wurde die Reaktion auf Vollständigkeit überprüft. Im Fall einer unvollständigen Entschützung wurde der Vorgang wiederholt.

Alloc-Entschützung

Unter Argon-Atmosphäre und im Dunkeln wurde eine Lösung aus 0.1 eq Pd(PPh₃)₄ und 20.0 eq PhSiH₃ in trockenem DCM (maximal 83 mL/mmol Katalysator) zu 1.0 eq *N*-Alloc-geschützten, am Harz gebundenen Peptid gegeben und 3 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert und gewaschen.

Peptidkupplung

Für die Erweiterung der Peptidkette an fester Phase wurden die zu kuppelnde, *N*-geschützte Aminosäure und die Kupplungsreagenzien in DMF gelöst und mit dem Harz bei RT 16 bis 24 h geschüttelt. Die einzusetzenden Ansätze beziehen sich dabei auf die nach dem Beladen des Harzes berechnete Konzentration der geladenen, ersten Aminosäure. Nach dem Filtrieren und Waschen wurde die Reaktion durch den Kaiser-Test oder mit Hilfe einer HPLC-Analyse auf vollständige Umsetzung untersucht. Bei vollständiger Umsetzung wurde der *N*-Terminus entschützt und mit der nächsten Aminosäure gekuppelt.

Fmoc-Test

Der Fmoc-Test basiert auf der Bildung des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes, welches ein UV-Absorptionsmaximum bei 301 nm besitzt und bei der Fmoc-Entschützensreaktion entsteht. Über die UV-Absorption bei 301 nm kann somit die Konzentration von abgespaltener Fmoc-Gruppe und damit die Konzentration von an Harz gebundener Aminosäure berechnet werden. Dazu wurden 5 bis 10 mg des geladenen Harzes mit 1 mL 20 % Piperidin in DMF versetzt und 20 min geschüttelt. Durch Filtration über Glaswolle wurde das Harz von der Lösung getrennt. 100 µL dieser Lösung wurden mit 10 mL DMF verdünnt und bei einer Wellenlänge von 301 nm die Absorption gemessen, wobei DMF als Referenz diente. Es wurden drei Messungen durchgeführt und mit dem Durchschnittswert der Absorption wurde der Beladungsgehalt des Harzes nach folgender Formel errechnet.⁸⁶

$$\text{Beladungsgehalt [mmol/g]} = \frac{101 \cdot A(301\text{nm})}{7.8 \cdot m(\text{Harz})}$$

A(301nm) = Absorption bei 301 nm

m(Harz) = Masse des für den Test eingesetzten Harzes

Kaiser-Test

Mit Hilfe des Kaiser-Tests kann eine Festphasen-Peptidkupplung auf 100 %ige Umsetzung des am Harz gebundenen Peptids überprüft werden. Der Test beruht dabei auf der Reaktion von zwei Ninhydrin-Molekülen mit einem primären Amin zu einer stark violetten Imin-Verbindung (*Ruhemanns Purpur*).¹²⁴ Für den sensitiven Test genügte es ein Paar Harzkügelchen mit abs. EtOH mehrmals zu waschen und mit je 100 µL Lösung A und B zu mischen. Nach heizen mittels eines Heißluftföns wies keine Farbänderung auf eine vollständige Peptidkupplung hin. Falls sich jedoch die Mischung intensiv blau oder violett färbte, bedeutete dies, dass noch freie NH₂-Gruppen vorhanden waren, die die Farbreaktion eingehen konnten. In diesem Fall wurde die vorangegangene Kupplung wiederholt.

Lösung A: 0.5 g Ninhydrin in 10 mL EtOH.

Lösung B: 0.4 mL einer 1 mM KClNaq Lösung in 20 mL Pyridin.

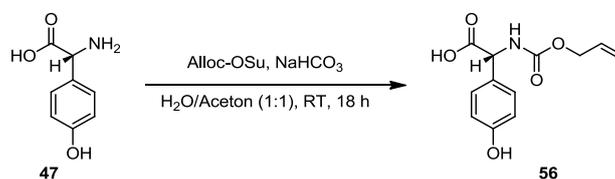
Abspaltung der am Harz gebundenen Peptidkette

Unter milden, sauren Bedingungen wurden am Harz gebundene Aminosäuren bzw. Peptidketten vom 2-Chlortritylchlorid-Harz gelöst. Hierzu wurde der Reaktor mit Harz mit einer 0.6 %igen TFA Lösung in DCM für 5 min bei RT geschüttelt. Es wurde filtriert, wobei das Filtrat gesammelt und das Harz erneut mit der TFA-Lösung versetzt und 5 min geschüttelt wurde. Nach der vierten Wiederholung wurde weitere vier Mal mit MeOH vom Harz eluiert. Die gesammelten Filtrate wurden unter reduziertem Druck konzentriert und mittels HPLC und HPLC-MS analysiert.

Für HPLC-Kontrollproben wurden wenige Harzkügelchen ein Mal mit 0.5 bis 1 mL der 0.6 %igen TFA Lösung in DCM versetzt und für 10 bis 15 min bei RT geschüttelt. Die Harzkügelchen wurden durch Filtration über Glaswolle von der Lösung getrennt, die im Argon-Strom aufkonzentriert wurde. Der Rückstand wurde für die HPLC-Messung in ACN bzw. H₂O gelöst.

III.12. Synthese der Bausteine für die SPPS

III.12.1. N-Alloc-D-4-HPG (56)

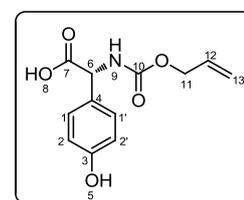


D-4-HPG (**47**) (1.00 g, 6 mmol, 1.00 eq) und NaHCO_3 (0.73 g, 8.7 mmol, 1.45 eq) wurden in einem 1:1-Gemisch aus Wasser und Aceton (25 mL, 4 mL/mmol) vorgelegt. Es wurde *N*-Alloc-Succinimidester (1.17 g, 6 mmol, 1.00 eq) bei RT unter Rühren zugegeben und 18 h gerührt. Das Aceton wurde unter vermindertem Druck entfernt und die basische wässrige Phase zwei Mal mit EtOAc gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung auf pH 1 bis 2 eingestellt und drei Mal mit EtOAc extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 + 0.1 % TFA, $R_f = 0.25$) gereinigt. Dies ergab das gewünschte Produkt **56** als weißes Pulver und in einer Ausbeute von 85 % (1,28 g, 5.09 mmol).

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_5$.

Molmasse: 251.24 g/mol.

ESI-MS (negativ): $m/z = 250.1$ [M-H].

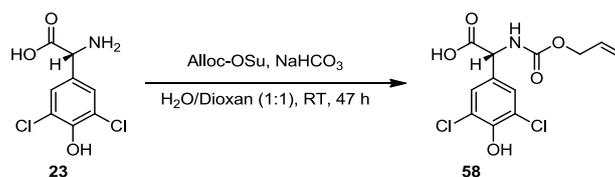


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 12.66$ (br, 1 H, H-8), 9.45 (br, 1 H, H-5), 7.87 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, H-9), 7.18 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.72 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 5.96-5.83 (m, 1 H, H-12), 5.30 (d, $J = 17.2$ Hz, 1 H, H-13), 5.17 (d, $J = 10.5$ Hz, 1 H, H-13), 5.00 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, H-6), 4.48 (d, $J = 5.2$ Hz, 2 H, H-11).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 172.5$ (1 C, C-7), 157.1 (1 C, C-10), 155.6 (1 C, C-3), 133.5 (1 C, C-12), 128.9 (2 C, C-1, C-1'), 127.2 (1 C, C-4), 117.0 (1 C, C-13), 115.1 (2 C, C-2, C-2'), 64.5 (1 C, C-6), 57.5 (1 C, C-11).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.⁹⁰

III.12.2. N-Alloc-3,5-dichlor-D-4-HPG (**58**)



209 mg (0.89 mmol, 1.0 eq) 3,5-Dichlor-D-4-HPG (**23**) wurden in 25 mL Wasser und 16 mL 1,4-Dioxan vorgelegt. 67 mg (0.80 mmol, 0.9 eq) NaHCO₃ und 174 mg (0.89 mmol, 1.0 eq) *N*-Alloc-Succinimidester wurden bei RT unter Rühren zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 47 h wurde die Reaktionslösung mit Wasser verdünnt und ein pH von 8 bis 9 eingestellt. Die basische wässrige Phase wurde zwei Mal mit EtOAc gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung auf pH 1 bis 2 eingestellt und drei Mal mit EtOAc extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Aufarbeitung wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 + 0.1 % TFA, R_f=0.18) gereinigt. Dies ergab das gewünschte Produkt **58** als ein blass-gelbes Pulver und in einer Ausbeute von 76 % (216 mg, 0.68 mmol).

Summenformel: C₁₂H₁₁Cl₂NO₅.

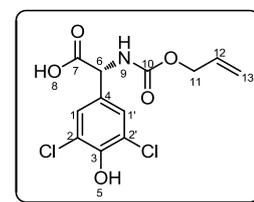
Molmasse: 320.13 g/mol.

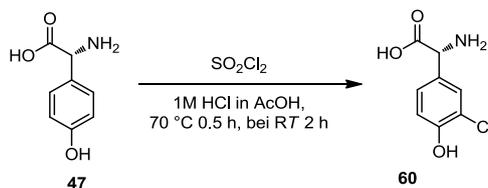
EI (70 eV) *m/z* (%): 319.0 (15) [M]⁺, 276.0 (6), 261.0 (14), 234.0 (26), 189.0 (100), 161.0 (12), 101 (18), 85.1 (18), 57.1 (42).

HR-ESI-MS (positiv): *m/z* = 320.0087 [M + H]⁺ (*m/z* = 320.0093 [M + H]⁺ berechnet für C₁₂H₁₂Cl₂NO₅), 641.0074 [2M + H]⁺ (*m/z* = 641.0077 [2M + H]⁺ berechnet für C₂₄H₂₃Cl₄N₂O₁₀).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.26 (br, 1 H, H-8), 8.07 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, H-9), 7.42 (s, 2 H, H-1, H-1'), 5.95-5.85 (m, 1 H, H-12), 5.29 (d, *J* = 17.2 Hz, 1 H, H-13), 5.18 (d, *J* = 10.4 Hz, 1 H, H-13), 5.12 (d, *J* = 8.29 Hz, 1 H, H-6), 4.49 (d, *J* = 4.9 Hz, 2 H, H-11).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 171.6 (1 C, C-7), 155.6 (1 C, C-10), 148.8 (1 C, C-3), 133.4 (1 C, C-4), 130.4 (1 C, C-12), 128.0 (2 C, C-1, C-1'), 122.0 (2 C, C-2, C-2'), 117.2 (1 C, C-13), 64.7 (1 C, C-6), 56.5 (1 C, C-11).



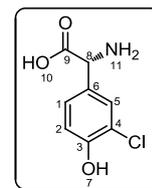
III.12.3. 3-Chlor-D-4-HPG (60)

835.8 mg (5 mmol, 1.0 eq) D-4-HPG (**47**) wurden in 17 mL einer 1 N HCl-Lösung in Essigsäure suspendiert. 0.93 mL (1.55 g 11.5 mmol, 2.3 eq) Sulfurylchlorid wurden tropfenweise über einen Zeitraum von 30 min zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 30 min bei 70 °C sowie weitere 2 h bei RT gerührt. Durch Zugabe von 315 mL Diethylether und Stehenlassen bei 4 °C für 2,5 d wurde das Produkt gefällt. Nach dem Filtrieren und Trocknen im Vakuum wurden 1.04 g blass-grünes Pulver erhalten, das laut ¹H-NMR-Spektrum zu 64 % aus dem Monochlorid **60** und 36 % aus Diethylether besteht. Daraus ergab sich für die Darstellung von **60** eine Ausbeute von 66 % (665.6 mg, 3.30 mmol).

Summenformel: C₈H₈Cl₁NO₃.

Molmasse: 201.61 g/mol.

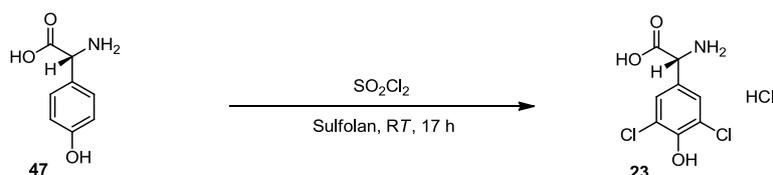
HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 202.0264$ [M+H]⁺ ($m/z = 202.0271$ [M + H]⁺ berechnet für C₈H₉ClNO₃).



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.70 (br, 1 H, H-10), 8.76 (br, 2 H, H-11), 7.50 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, H-5), 7.26 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1 H, H-1), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, H-2), 5.01 (br, 1 H, H-8).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.⁹¹

III.12.4. 3,5-Dichlor-D-4-HPG (23)



Unter Argon-Atmosphäre wurden in einem Schlenkcolben 3.43 g (20.00 mmol, 1.0 eq) D-4-Hydroxyphenylglycin (**47**) in 200 mL (10 mL/mmol, darauf ist zu achten!) Sulfolan suspendiert. 3.21 mL (5.36 g, 40.00 mmol, 2.0 eq) frisch dest. Sulfurylchlorid wurden unter Rühren bei RT tropfenweise über einen Tropftrichter innerhalb von 10 min zugegeben. Die gelbe Reaktionslösung wurde 2 h gerührt und anschließend wurden weitere 3.21 mL Sulfurylchlorid innerhalb von 10 min zugetropft. Nachdem die Reaktionsmischung weitere 15 h gerührt wurde, wurde das gewünschte Produkt als das Hydrochlorid-Salz mit Hilfe von trockenem DCM (600 mL) und trockenem Et₂O (300 mL) als farbloser Niederschlag gefällt. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend wurde der Niederschlag filtriert und mit kaltem trockenem DCM gewaschen. Das weiße Pulver wurde im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Salz **23** ergab eine Ausbeute von 85 % (4.62 g, 16.96 mmol).

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$.

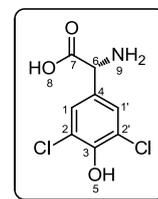
Molmasse: 236.05 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 235.1 [\text{M}+\text{H}]^+$, $219.1 [\text{M}-\text{NH}_2]^+$, $191.1 [\text{M}-\text{CO}_2]^+$, $165.1 [\text{M}-\text{Cl}_2]^+$.

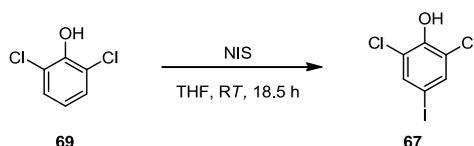
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 10.62$ (br, 1 H, H-8), 8.78 (br, 2 H, H-9), 7.53 (s, 2 H, H-1, H-1'), 5.09 (br, 1 H, H-6).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 169.3$ (1 C, C-7), 149.9 (1 C, C-3), 128.5 (2 C, C-1, C-1'), 125.8 (1 C, C-4), 122.3 (2 C, C-2, C-2'), 64.9 (1 C, C-6).

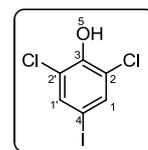
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹³⁷



III.12.5. 2,6-Dichlor-4-iodphenol (67)



In einem 250mL-Einhalskolben wurden 7.13 g (43.74 mmol, 1.0 eq) 2,6-Dichlorphenol in 90 mL abs. THF gelöst. Der Kolben wurde mit Alufolie abgedunkelt und 12.80 g (56.87 mmol, 1.3 eq) NIS wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 27 h bei RT gerührt und anschließend mit halbgesättigter wässriger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung und Diethylether behandelt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Diethylether extrahiert. Zur Entfernung von Verunreinigungen wurden die vereinigten organischen Phasen zwei Mal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und zwei Mal mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung gewaschen. Nachdem die organische Phase mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet wurde, wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gewünschte Produkt **67** wurde als ein blass gelbes Pulver in quantitativer Ausbeute (12.59 g, 43.59 mmol) erhalten.



Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{IO}$.

Molmasse: 288.90 g/mol.

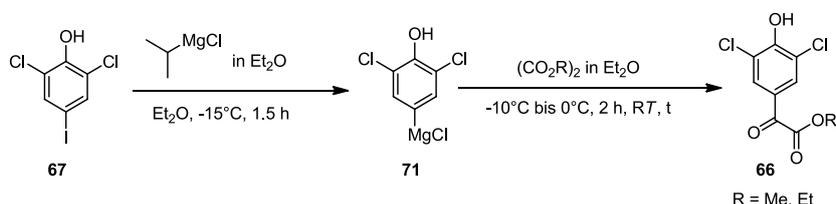
ESI-MS (negativ): $m/z = 286.8 [\text{M} - \text{H}]^-$, $572.8 [2\text{M} - \text{H}]^-$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 10.43$ (br, 1 H, H-5), 7.67 (s, 2 H, H-1, H-1').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 149.3$ (1 C, C-3), 136.2 (2 C, C-2, C-2'), 123.5 (2 C, C-1, C-1'), 81.0 (1 C, C-4).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹²⁵

III.12.6. (3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoessigsäuremethylester (66)



Unter Argon-Atmosphäre wurde 2,6-Dichlor-4-iodphenol **67** (2,0 g, 6.92 mmol, 1.0 eq) in einem Schlenk Kolben in 30 mL trockenem Diethylether gelöst (4mL/mmol **67**) und auf -15 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 13.9 mL (27.69 mmol, 4.0 eq) einer 2 M *iso*-Propylmagnesiumchlorid-Diether-Lösung tropfenweise mittels einer Spritze über ein Septum zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 1.5 h wurde diese Lösung bei -10°C zu einer Lösung aus Oxalsäurediethyl- bzw. methylester (5.0 eq) in 100 mL trockenem Diethylether (3 mL/mmol (CO₂R)₂) gegeben. Die gelbe Suspension wurde 2 h bei -10 bis 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 1 N HCl bis zur Entfärbung (pH 1) gequenchet. Nachdem die wässrige Phase zwei Mal mit Et₂O extrahiert wurde, wurden die vereinigten organischen Phasen mit H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Entfernen des Lösungsmittels lieferte einen gelben oder grünen Feststoff bzw. eine Flüssigkeit. Die säulenchromatographische Aufreinigung (R = Et: *n*-Pentan/ Aceton 2:1, 1:1, 0:1, MeOH/ Aceton 1:2, 1:1, 1:0, R_f(Pentan/ Aceton, 2:1) = 0.27; R = Me: *n*-Pentan/ Aceton 3:1, 2:1, 1:5, 1:10, 1:100, 0:1, R_f(Pentan/ Aceton, 2:1) = 0.21) lieferte das gewünschte Produkt als dunkel-gelbes Pulver.

Tabelle III-15. Einwaage des Oxalsäuredialkylesters, Reaktionszeit und Ausbeute für die Grignard-Reaktion.

R	Einwaage [(CO ₂ R) ₂]	Reaktionszeit bei RT	Ausbeute
Et	4.7 mL (5.06 g, 34.6 mmol, 5.0 eq)	23 h	85 % (1.55 g, 5.89 mmol)
Me	4.08 g (34.6 mmol, 5.0 eq)	17 h	62 % (1.07 g, 4.30 mmol)

Summenformel: $C_{10}H_8Cl_2O_4$.

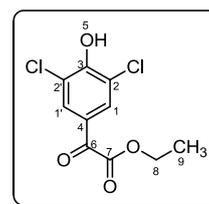
Molmasse: 263.07g/mol.

ESI-MS (negativ): $m/z = 261.0 [M - H]^-$.

HR-ESI-MS (negativ): $m/z = 260.9728 [M - H]^-$ ($m/z = 260.9721 [M - H]^-$ berechnet für $C_{10}H_7Cl_2O_4$).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.63$ (s, 2 H, H-1, H-1'), 4.33 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, H-8), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, H-9).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 180.7$ (1 C, C-7), 164.9 (1 C, C-3), 164.3 (1 C, C-6), 129.8 (2 C, C-1, C-1'), 124.0 (2 C, C-2, C-2'), 114.0 (1 C, C-4), 61.5 (1 C, C-8), 14.0 (1 C, C-9).

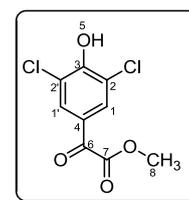


Summenformel: $C_9H_6Cl_2O_4$.

Molmasse: 249.05 g/mol.

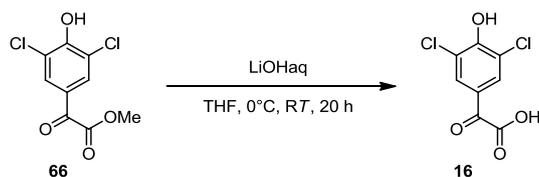
ESI-MS (negativ): $m/z = 247.0 [M - H]^-$.

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.96$ (s, 2 H, H-1, H-1'), 3.91 (s, 3 H, H-8).



Die spektroskopischen Daten des Ketomethylesters stimmen mit denen aus der Literatur überein.⁶⁸

III.12.7. 2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoessigsäure (16)

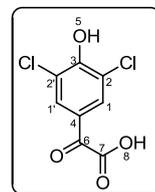


In einem 500 mL-Rundkolben wurden 1.16 g (4.41 mmol, 1.0 eq) des Ketoesters **66** in 8 mL abs. THF gelöst. 132 mL (13.22 mmol, 3.0 eq) einer 0.1 N LiOH-Lösung (aq) wurden bei 0 °C über einen Zeitraum von 40 min tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und 20 h gerührt. Die erhaltene Lösung wurde zwei Mal mit Et₂O gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mittels 10 %iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 1 bis 2 eingestellt und zwei Mal mit Et₂O extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Extraktion wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte die Ketosäure **16** als ein blass gelbes Pulver in einer Ausbeute von 75 % (773 mg, 3.29 mmol).

Summenformel: C₈H₄Cl₂O₄.

Molmasse: 235.02 g/mol.

ESI-MS (negativ): $m/z = 233.0$ [M - H]⁻.

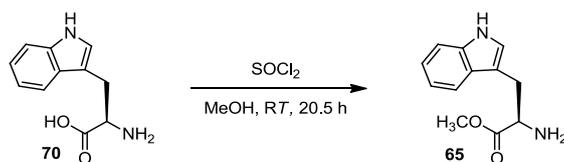


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.91 (s, 2 H, H-1, H-1').

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 184.50 (1 C, C-7), 164.77 (1 C, C-3), 155.06 (1 C, C-6), 130.21 (2 C, C-1, C-1'), 124.66 (1 C, C-4), 122.53 (2 C, C-2, C-2).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹²⁷

III.12.8. D-Tryptophanmethylester (65)

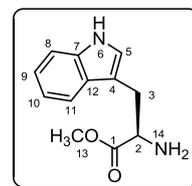


Unter Argon-Atmosphäre wurden 5.00 g (24.48 mmol, 1.0 eq) D-Trp (**70**) in einem 250 mL-Schlenkcolben in 75 mL trockenem MeOH (3 mmol/mmol) suspendiert. 3.2 mL (5.20 g, 44.07 mmol, 1.8 eq) Thionylchlorid wurden tropfenweise zugegeben. Nach 20.5 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand zwei Mal in DCM resuspendiert und im Vakuum aufkonzentriert. Anschließend wurde der Rückstand über eine Glasfritte filtriert und mit DCM gewaschen. Der D-Tryptophanmethylester (**65**) wurde als das Hydrochlorid-Salz in einer Ausbeute von 96 % (5.11 g, 23.39 mmol) als weißes Pulver erhalten.

Summenformel: $C_{12}H_{14}N_2O_2$.

Molmasse: 218.25 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 219.1 [M + H]^+$, $241.1 [M + Na]^+$, $202.1 [M - NH_2]^+$, $160.1 [M - CO_2H + H]^+$.

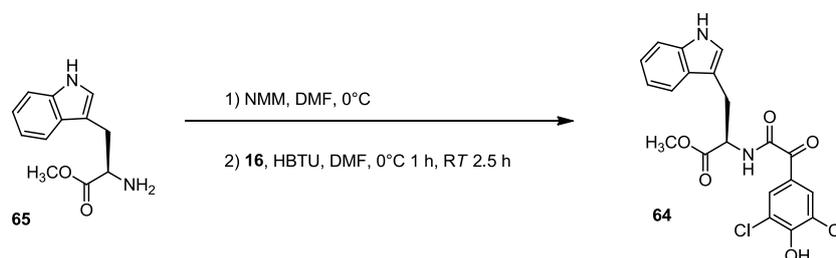


1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.85$ (br, 1 H, H-6), 7.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, H-11), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, H-8), 7.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, H-5), 7.06 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1 H, H-9), 6.97 (td, $J = 7.4, 1.2$ Hz, 1 H, H-10), 3.62 (t, $J = 6.3$ Hz, 1 H, H-2), 3.55 (s, 3 H, H-13), 3.02 (dd, $J = 14.1, 6.2$ Hz, 1 H, H-3), 2.93 (dd, $J = 14.1, 6.5$ Hz, 1 H, H-3), 1.78 (br, 2 H, H-14).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 175.7$ (1 C, C-1), 136.1 (1 C, C-7), 127.4 (1 C, C-12), 123.6 (1 C, C-5), 120.9 (1 C, C-10), 118.3 (1 C, C-11), 118.2 (1 C, C-9), 111.4 (1 C, C-8), 109.9 (1 C, C-4), 55.2 (1 C, C-2), 51.3 (1 C, C-13), 30.8 (1 C, C-3).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen des Enantiomers aus der Literatur überein.¹²⁶

III.12.9. N-(2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoaceto)-D-tryptophanmethylester (64)



1.42 g (6.50 mmol, 1.3 eq) *D*-Trp-OMe wurden in 25 mL DMF (5 mL/mmol) gelöst. NMM (0.71 mL, 0.66 g, 6.50 mmol, 1.3 eq) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 40 min bei 0 °C gerührt, wobei in diesem Zeitraum Ketosäure **16** (1.18 g, 5.00 mmol, 1.0 eq) und HBTU (2.47 g, 6.50 mmol, 1.3 eq) gelöst in 25 mL DMF (5 mL/mmol) zugegeben wurden. Nachdem die Reaktionsmischung 1 h bei 0 °C gerührt wurde, wurde 2.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 150 mL EtOAc verdünnt und drei Mal mit 40 %iger Zitronensäure und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan/Aceton, 1:5, R_f = 0.51) wurde ein gelber Schaum (**64**) in einer Ausbeute von 65 % (1.40 g, 3.23 mmol) erhalten.

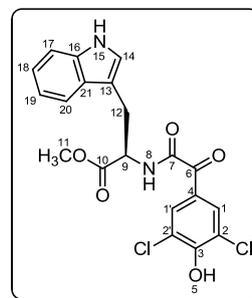
Summenformel: C₂₀H₁₆Cl₂N₂O₅.

Molmasse: 435.26 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 457.1$ [M+Na]⁺.

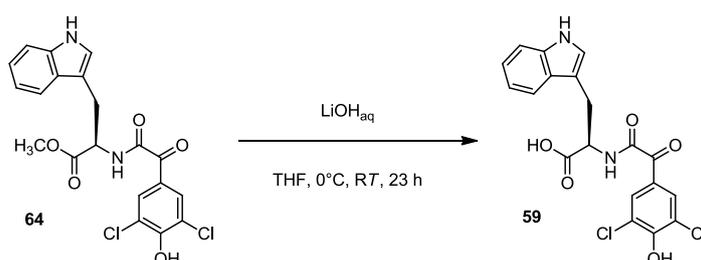
HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 435.0509$ [M + H]⁺ ($m/z = 435.0515$ [M + H]⁺ berechnet für C₂₀H₁₇Cl₂N₂O₅), 871.0909 [2M + H]⁺ ($m/z = 871.0921$ [2M + H]⁺ berechnet für C₄₀H₃₃Cl₄N₄O₁₀).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.89 (s, 1 H, H-15), 9.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, H-8), 7.79 (s, 2 H, H-1, H-1'), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-20), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H-17), 7.18 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, H-14), 7.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H-18), 6.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 1 H, H-19), 4.74-4.67 (m, 1 H, H-9), 3.70 (s, 3 H, H-11), 3.30 (dd, *J* = 14.7, 4.9 Hz, 1 H, H-12), 3.17 (dd, *J* = 14.7, 9.4 Hz, 1 H, H-12).



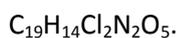
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 186.2 (1 C, C-6), 171.5 (1 C, C-10), 164.5 (1 C, C-7), 154.9 (1 C, C-3), 136.1 (1 C, C-16), 130.3 (2 C, C-1, C-1'), 127.0 (1 C, C-4), 125.2 (1 C, C-21), 123.9 (1 C, C-14), 122.4 (2 C, C-2, C-2'), 121.0 (1 C, C-18), 118.5 (1 C, C-19), 118.0 (1 C, C-20), 111.6 (1 C, C-17), 109.2 (1 C, C-13), 53.0 (1 C, C-9), 52.2 (1 C, C-11), 26.6 (1 C, C-12).

III.12.10. N-(2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoaceto)-D-tryptophan (59)

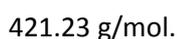


In einem 500 mL-Rundkolben wurden 2.09 g (4.81 mmol, 1.0 eq) des Methylesters **65** in 8 mL abs. THF gelöst. 144 mL (14.43 mmol, 3.0 eq) einer 0.1 N LiOH-Lösung (aq) wurden bei 0 °C über einen Zeitraum von 40 min tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und 23 h gerührt. Nachdem THF unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde die basische wässrige Phase zwei Mal mit Et₂O gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mittels 10 %iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 1 bis 2 eingestellt und zwei Mal mit Et₂O extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Extraktion wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das Indol-Derivat **59** als einen beigen Schaum in quantitativer Ausbeute (2.03 g, 4.81 mmol).

Summenformel:



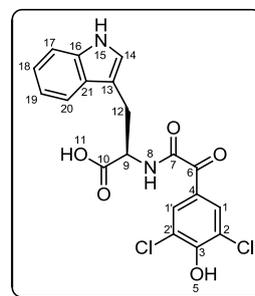
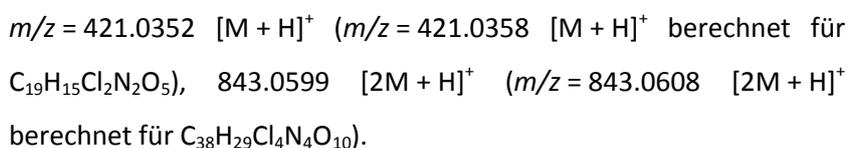
Molmasse:



ESI-MS (negativ):



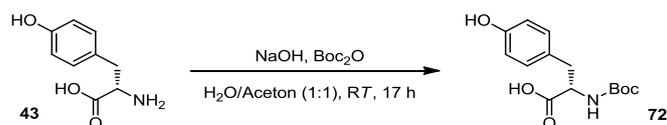
HR-ESI-MS (positiv):



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 13.03 (br, 1 H, H-11), 10.87 (s, 1 H, H-15), 9.20 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, H-8), 7.82 (s, 2 H, H-1, H-1'), 7.56 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, H-20), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, H-17), 7.17 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, H-14), 7.06 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, H-18), 6.97 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, H-19), 4.66-4.60 (m, 1 H, H-9), 3.31 (dd, J = 14.7, 4.1 Hz, 1 H, H-12), 3.13 (dd, J = 14.7, 9.8 Hz, 1 H, H-12).

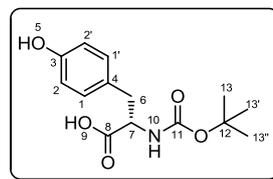
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 186.5 (1 C, C-6), 171.6 (1 C, C-10), 164.6 (1 C, C-7), 154.7 (1 C, C-3), 136.1 (1 C, C-16), 130.3 (2 C, C-1, C-1'), 127.0 (1 C, C-4), 125.3 (1 C, C-21), 123.8 (1 C, C-14), 122.3 (2 C, C-2, C-2'), 121.0 (1 C, C-18), 118.4 (1 C, C-19), 118.1 (1 C, C-20), 111.5 (1 C, C-17), 109.6 (1 C, C-13), 59.8 (1 C, C-9), 26.6 (1 C, C-12).

III.12.11. N-tert-Butyloxycarbonyl-L-tyrosin (**72**)



In einem 2 L-Rundkolben wurden 16.86 g (93.05 mmol, 1.0 eq) L-Tyrosin (**43**) und 186 mL (186.10 mmol, 2.0 eq) 1 N wässrige Natronlauge in 380 mL eines 1:1-Gemisches aus Wasser und Aceton zusammengegeben und gerührt. 28.43 g (130.27 mmol, 1.4 eq) Di-*tert*-butyldicarbonat wurden in 190 mL Aceton gelöst und über einen Tropftrichter bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 17 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Aceton unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde mit DCM gewaschen. Dann wurde die wässrige Phase mit verd. HCl auf pH 2 bis 3 angesäuert und drei Mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden drei Mal mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung und ein Mal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Filtrieren wurde das Produkt vom Lösungsmittel im Vakuum befreit. N-Boc-L-Tyrosin (**72**) wurde in quantitativer Ausbeute (26.16 g, 93.00 mmol) erhalten.

Summenformel: C₁₄H₁₉NO₅.



Molmasse: 281.30 g/mol.

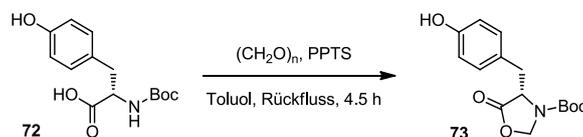
ESI-MS (positiv): $m/z = 304.1$ [M + Na]⁺, 585.2 [2M + Na]⁺, 866.3 [3M + Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 12.49$ (br, 1 H, H-9), 9.18 (s, 1 H, H-5), 7.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.98 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, H-10), 6.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 4.04-3.95 (m, 1 H, H-7), 2.88 (dd, $J = 13.9, 4.6$ Hz, 1 H, H-6), 2.69 (dd, $J = 13.7, 10.0$ Hz, 1 H, H-6), 1.33 (s, 9 H, H-13, H-13', H-13'').

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 173.7$ (1 C, C-8), 155.8 (1 C, C-11), 155.4 (1 C, C-3), 130.0 (2 C, C-1, C-1'), 128.0 (1 C, C-4), 114.9 (2 C, C-2, C-2'), 78.0 (1 C, C-12), 55.5 (1 C, C-7), 35.7 (1 C, C-6), 28.2 (3 C, C-13, C-13', C-13'').

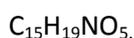
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹²⁷

III.12.12. (S)-N-tert-Butyloxycarbonyl-4-(4-Hydroxybenzyl)-1,3-oxazolidin-5-on (**73**)



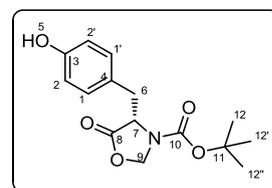
27.17 g (96.57 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-L-Tyrosin (**72**) wurden in einem 500 mL-Rundkolben in 70 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 200 mL Toluol gegeben. 14.50 g (482.86 mmol, 5.0 eq) Paraformaldehyd und 2.43 g (9.66 mmol, 0.10 eq) Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS) wurden zugegeben. Der Kolben wurde mit einem Wasserabscheider ausgestattet und die Reaktionsmischung wurde unter Rühren für 4.5 h unter Rückfluss erhitzt, wobei Kondensationswasser über den Wasserabscheider entfernt wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und im Vakuum aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen. Die EtOAc-Phase wurde drei Mal mit dest. Wasser, drei Mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Oxazolidinon **73** wurde als beiges Pulver in einer Ausbeute von 63 % (17.87 g, 60.91 mmol) erhalten.

Summenformel:



Molmasse:

293.32 g/mol.



ESI-MS (negativ):

$m/z = 292.1 [\text{M} - \text{H}]^-$, $389.2 [2\text{M} - \text{Na}]^-$.

EI (70 eV) m/z (%):

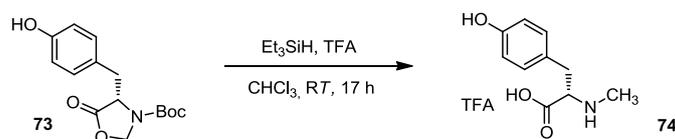
293.1 (8) [M]⁺, 237.1 (15) [M - *tert*-Bu + H]⁺, 220.0 (8) [M - *tert*-BuO]⁺, 164.1 (4), 107.1 (100), 77.1 (6), 57.1 (43).

HR-ESI-MS (positiv):

$m/z = 294.1335 [\text{M} + \text{H}]^+$ ($m/z = 294.1341 [\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für C₁₅H₂₀NO₅).

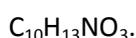
¹H-NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 6.95$ (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 5.22 (br, 1 H, H-9), 4.45 (br, 1 H, H-7), 4.31 (br, 1 H, H-9), 3.22 (m, 1 H, H-6), 3.00 (d, $J = 13.8$ Hz, 1 H, H-6), 1.51 (s, 9 H, H-12, H-12', H-12'').

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 175.5$ (1 C, C-10?), 174.4 (1 C, C-8), 158.0 (1 C, C-3), 131.8 (2 C, C-1, C-1'), 127.0 (1 C, C-4), 116.4 (2 C, C-2, C-2'), 82.9 (1 C, C-11), 79.2 (1 C, C-9), 56.5 (1 C, C-7), 37.9 (1 C, C-6), 28.6 (3 C, C-12, C-12', C-12'').

III.12.13. *N*-Methyl-*L*-Tyrosin · TFA (**74**)

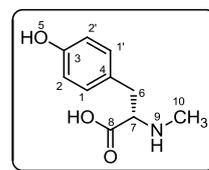
In einem 500 mL-Rundkolben wurden 17.87 g (60.91 mmol, 1.0 eq) (*S*)-*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-(4-Hydroxy-benzyl)-1,3-oxazolidin-5-on (**73**) in 182 mL (3 mL/mmol) Chloroform gelöst. Anschließend wurde unter Rühren zuerst 29 mL (21.25 g, 182.73 mmol, 3.0 eq) Triethylsilan und dem folgend 182 mL TFA (CHCl₃:TFA = 1:1) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT 17 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum aufkonzentriert und ein Mal in Toluol und zwei Mal in Chloroform resuspendiert und erneut im Vakuum aufkonzentriert, um überschüssige TFA zu entfernen. Das ausgefallene Produkt wurde filtriert und mit kaltem Aceton gewaschen. Dies ergab 7.29 g der gewünschten *N*-methylierten Aminosäure als weißes Pulver. Aus der Mutterlauge, die zwölf Tage bei RT stehen gelassen wurde, konnten weitere 5.74 g *N*-Methyl-*L*-Tyrosin · TFA (**74**) gewonnen werden. Insgesamt wurde eine Ausbeute von 69 % (13.03 g, 42.13 mmol) erhalten.

Summenformel:



Molmasse:

195.22 g/mol.



ESI-MS (negativ):

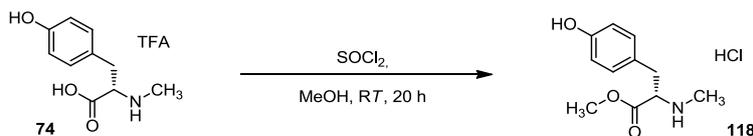
 $m/z = 194.1 [M - H]^-$, $389.2 [2M - H]^-$.EI (70 eV) m/z (%):195.1 (8) [M]⁺, 150.1 (24) [M - CO₂H]⁺, 135.0 (8) [M - CO₂H - Me]⁺,
107.0 (58), 88.0 (100), 77.0 (10).

¹H-NMR (300 MHz, MeOD +1 Tropfen NaOH): $\delta = 6.92$ (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 3.11 (dd, $J = 7.1, 6.1$ Hz, 1 H, H-7), 2.81 (dd, $J = 13.6, 6.1$ Hz, 1 H, H-6), 2.65 (dd, $J = 13.6, 7.0$ Hz, 1 H, H-6), 2.25 (s, 3 H, H-10).

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD +1 Tropfen NaOH): $\delta = 181.8$ (1 C, C-8), 165.2 (1 C, C-3), 131.0 (2 C, C-1, C-1'), 125.1 (1 C, C-4), 119.3 (2 C, C-2, C-2'), 68.8 (1 C, C-7), 40.0 (1 C, C-6), 34.7 (1 C, C-10).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹²⁸

III.12.14. N-Methyl-L-Tyrosinmethylester HCl (118)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 7.29 g (23.57 mmol, 1.0 eq) N-Me-L-Tyrosin · TFA (**74**) in einem 250 mL-Schlenkcolben in 70 mL trockenem MeOH (3 mL/mmol) suspendiert. 5.1 mL (8.41 g, 70.71 mmol, 3.0 eq) Thionylchlorid wurden tropfenweise zugegeben. Nach 20 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand zweimal mit Et_2O gewaschen. Der N-Methyl-L-Tyrosinmethylester (**118**) wurde als das Hydrochlorid-Salz in quantitativer Ausbeute (5.79 g, 23.56 mmol) als beiger Schaum erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_3$.

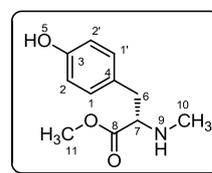
Molmasse: 209.24 g/mol.

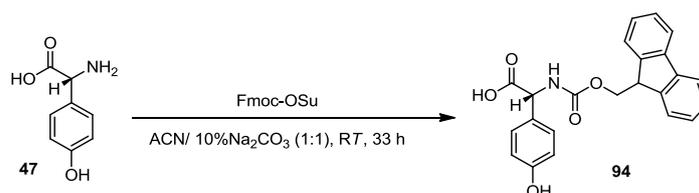
ESI-MS (positiv): $m/z = 210.1 [\text{M} + \text{H}]^+$, $232.1 [\text{M} + \text{Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9.17$ (s, 1 H, H-5), 6.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 3.54 (s, 3H, H-11), 3.24 (t, $J = 6.9$ Hz, 1 H, H-7), 2.70 (dd, $J = 7.0$ Hz, 3.5 Hz, 2H, H-6), 2.19 (s, 3 H, H-10).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 174.5$ (1 C, C-8), 155.7 (1 C, C-3), 130.0 (2 C, C-1, C-1'), 127.8 (1 C, C-4), 114.9 (2 C, C-2, C-2'), 64.6 (1 C, C-7), 51.1 (1 C, C-11), 37.8 (1 C, C-6), 33.9 (1 C, C-10).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹²⁹



III.12.15. N-9-Flourenylmethoxycarbonyl-D-4-HPG (94)

Zu einer Suspension aus 1.0 g (5.98 mmol, 1.0 eq) D-4-HPG (**47**) in ACN/10 % Na₂CO₃(aq) (1:1) wurde bei RT und unter Rühren 2.02 g (5.98 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Succinimid, suspendiert in ACN, portionsweise über einen Zeitraum von 30 min zugegeben. Die Suspension wurde 33 h gerührt und anschließend wurde ACN unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit destilliertem Wasser (3.3 mL/mmol) verdünnt und zwei Mal mit Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 2 M HCl auf pH 3 angesäuert und drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden zwei Mal mit einer gesättigten wässrigen NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, wurde das Produkt **94** als weißes Pulver in einer Ausbeute von 97 % (2.17 g, 5.58 mmol) erhalten.

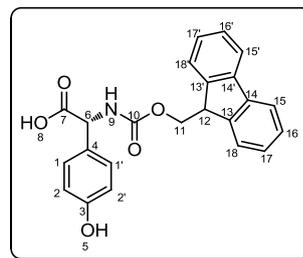
Summenformel: C₂₃H₁₉NO₅.

Molmasse: 389.40 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 390.15 [M + H]^+$, $412.13 [M + Na]^+$.

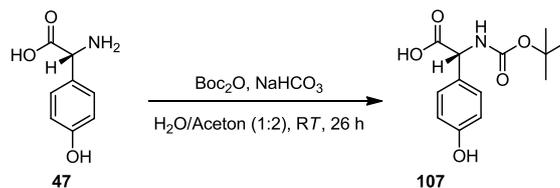
ESI-MS (negativ): $m/z = 388.05 [M - H]^-$.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 9.52$ (br, 1 H, H-5), 8.09 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-9), 7.88 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H, H-15, H-15'), 7.76 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H, H-18, H-18'), 7.41 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, H-16, H-16'), 7.31 (q, $J = 7.4, 6.6$ Hz, 2 H, H-17, H-17'), 7.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 5.03 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-6), 4.24 (m, 3 H, H-11, H-12).



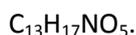
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen für das Enantiomer aus der Literatur überein.⁹⁹

III.12.16. N-Boc-D-4-HPG (107)



In einem 1 L-Rundkolben wurden 30.00 g (179.50 mmol, 1.0 eq) D-4-HPG (**47**) in 200 mL Aceton vorgelegt. Unter Rühren wurden 15.08 g (179.50 mmol, 1.0 eq) NaHCO₃ gelöst in 200 mL Wasser zugegeben. Zu diesem Gemisch wurden 54.85 g (251.30 mmol, 1.4 eq) Di-*tert*-butyldicarbonat gelöst in 200 mL Aceton über einen Tropftrichter bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 26 h bei RT gerührt (laut HPLC-Analyse war das Edukt nach 5 h verbraucht). Anschließend wurde das Aceton unter vermindertem Druck entfernt. Die basische, wässrige Phase wurde mit DCM gewaschen. Dann wurde die wässrige Phase mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung auf pH 2 bis 3 angesäuert und sieben Mal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Filtrieren wurde das Produkt **107** vom Lösungsmittel im Vakuum befreit. N-Boc-D-4-HPG (**107**) wurde in quantitativer Ausbeute (47.95 g, 179.34 mmol) erhalten.

Summenformel:



Molmasse:

267.28 g/mol.

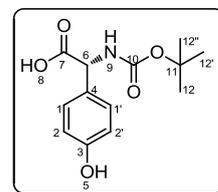
ESI-MS (negativ):

$m/z = 266.1 [\text{M} - \text{H}]^-$, $533.2 [2\text{M} - \text{H}]^-$.

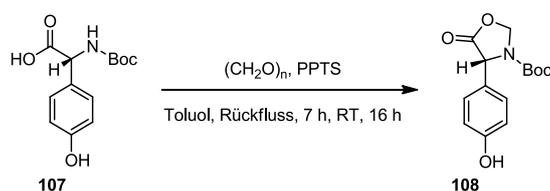
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 12.57$ (br, 1 H, H-8), 9.43 (br, 1 H, H-5), 7.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, H-9), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 4.95 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, H-6), 1.38 (s, 9 H, H-12, H-12', H-12'').

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 172.7$ (1 C, C-7), 157.0 (1 C, C-10), 155.1 (1 C, C-3), 128.9 (2 C, C-1, C-1'), 127.5 (1 C, C-4), 115.1 (2 C, C-2, C-2'), 78.2 (1 C, C-11), 57.1 (1 C, C-6), 28.2 (3 C, C-12, C-12', C-12'').

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen für das Enantiomer aus der Literatur überein.¹³⁰

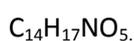


III.12.17. (R)-N-tert-Butyloxycarbonyl-4-(4-hydroxyphenyl)-1,3-oxazolidin-5-on (**108**)



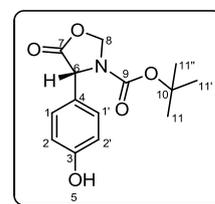
4.42 g (16.54 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-D-4-HPG (**107**) wurden in einem 1 L-Rundkolben in einem Minimum an DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 400 mL (20 mL/mmol) Toluol gegeben. 3.07 g (102.10 mmol, 6.2 eq) Paraformaldehyd und 0.51 g (2.04 mmol, 0.12 eq) Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS) wurden zugegeben. Der Kolben wurde mit einem Wasserabscheider ausgestattet und die Reaktionsmischung wurde unter Rühren für 7 h unter Rückfluss erhitzt, wobei Kondensationswasser über den Wasserabscheider entfernt wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und im Vakuum aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen. Die EtOAc-Phase wurde drei Mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Oxazolidinon **108** wurde als blass-gelbes Pulver in einer Ausbeute von 68 % (3.15 g, 11.28 mmol) erhalten.

Summenformel:



Molmasse:

279.29 g/mol.



ESI-MS (negativ):

$m/z = 278.1 [\text{M} - \text{H}]^-$, $557.2 [2\text{M} - \text{H}]^-$.

EI (70 eV) m/z (%):

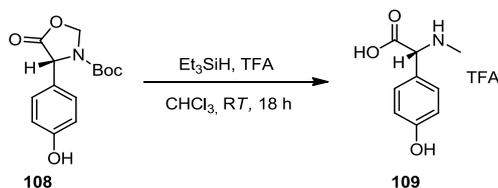
279.1 (34) $[\text{M}]^+$, 264.1 (22) $[\text{M} - \text{Me}]^+$, 223.0 (94), 206.1 (24), 179.1 (44), 57.1 (100).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 9.54$ (br, 1 H, H-5), 7.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 5.51 (dd, $J = 3.9, 0.8$ Hz, 1 H, H-8), 5.47 (d, $J = 3.9$ Hz, 1 H, H-8), 5.11 (s, 1 H, H-6), 1.29 (s, 9 H, H-11, H-11', H-11'').

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 171.69$ (1 C, C-7), 157.44 (1 C, C-3), 151.58 (1 C, C-9), 128.09 (1 C, C-4), 115.35 (4 C, C-Ar), 80.51 (1 C, C-6), 78.13 (1 C, C-8), 57.97 (1 C, C-10), 22.76 (3 C, C-11, C-11', C-11'').

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen für das Enantiomer aus der Literatur überein.¹³¹

III.12.18. N-Me-D-4-HPG (109)

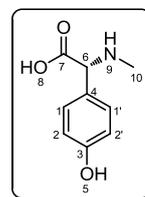


In einem 250 mL-Rundkolben wurden 2.94 g (10.54 mmol, 1.0 eq) (*R*)-*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-(4-hydroxyphenyl)-1,3-oxazolidin-5-on (**108**) in 50 mL (4.5 mL/mmol) Chloroform gelöst. Anschließend wurde unter Rühren zuerst 4.9 mL (3.52 g, 30.30 mmol, 2.9 eq) Triethylsilan und dem folgend 50 mL TFA (CHCl₃:TFA = 1:1) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum aufkonzentriert und jeweils ein Mal in Toluol und Dichlormethan sowie zwei Mal in Diethylether resuspendiert und erneut im Vakuum aufkonzentriert, um überschüssige TFA zu entfernen. Der Rückstand wurde in Aceton gelöst und unter vermindertem Druck wieder eingengt. Das gewünschte Produkt wurde mit Cyclohexan ausgefällt, filtriert und mit kaltem Aceton gewaschen. Dies ergab 2.30 g (7.79 mmol) *N*-Me-D-HPG · TFA (**109**) als weißes Pulver, was einer Ausbeute von 69 % entspricht.

Summenformel: C₉H₁₁NO₃.

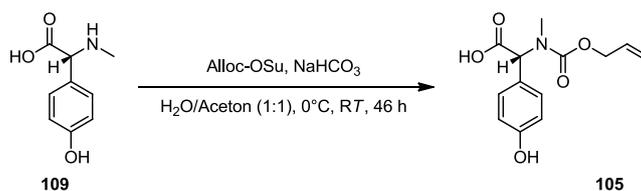
Molmasse: 181.19 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 151.0$ [M - NHMe]⁺.

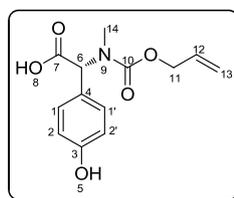


¹H-NMR (300 MHz, MeOD + 1 Tropfen NaOH): $\delta = 7.21$ (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 4.03 (s, 1 H, H-6), 2.34 (s, 3 H, H-10).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹³²

III.12.19. N-Alloc-N-Me-D-4-HPG (105)

788 mg (2.67 mmol, 1.0 eq) *N*-Me-D-HPG · HCl (**109**) wurden in 10 mL (4 mL/mmol) Wasser vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Die Suspension wurde mit NaHCO₃ neutralisiert und anschließend wurden 449 mg (5.34 mmol, 2.0 eq) NaHCO₃ bei 0 °C zugefügt. 574 mg (2.94 mmol, 1.1 eq) *N*-Alloc-Succinimidester wurden in 10 mL (4 mL/mmol) Aceton gelöst und in fünf Portionen zur Reaktionsmischung zugegeben. Dabei wurde die erste Portion bei 0 °C und die nächsten vier Portionen stündlich bei RT unter Rühren zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 46 h wurde das Aceton unter vermindertem Druck entfernt und die basische wässrige Phase zwei Mal mit Et₂O gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 4 N HCl(aq) auf pH 2 bis 3 eingestellt und drei Mal mit Et₂O extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Aufarbeitung wurden drei Mal mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, wobei das *N*-Alloc-*N*-Me-D-4-HPG (**105**) als ein gelblicher Feststoff zurückblieb. Die Ausbeute betrug 85 % (605 mg, 2.28 mmol).



Summenformel: C₁₃H₁₅NO₅.

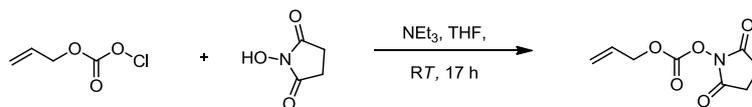
Molmasse: 265.26 g/mol.

HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 266.1020$ [M + H]⁺ ($m/z = 266.1028$ [M + H]⁺ berechnet für C₁₃H₁₆NO₅).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 9.50$ (br, 1 H, H-5), 7.07 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 5.98-5.89 (m, 1 H, H-12), 5.66 (br, 1 H, H-6), 5.29 (dq, $J = 17.3, 1.7$ Hz, 1 H, H-13), 5.19 (dq, $J = 10.5, 1.5$ Hz, 1 H, H-13), 4.58 (br, 2 H, H-11), 2.61 (br, 3 H, H-14).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 172.0$ (1 C, C-7), 170.3 (1 C, C-10), 157.4 (1 C, C-3), 133.3 (1 C, C-12), 130.4 (2 C, C-1, C-1'), 124.7 (1 C, C-4), 117.0 (1 C, C-13), 115.4 (2 C, C-2, C-2'), 65.5 (1 C, C-6), 56.5 (1 C, C-11), 30.5 (1 C, C-14).

III.12.20. Allyloxycarbonyl-N-succinimidester



Unter Argon-Atmosphäre wurden 3.2 mL (3.62 g, 30 mmol, 1.0 eq) Allylchlorformiat und 3.45 g (30 mmol, 1.0 eq) *N*-Hydroxysuccinimid in 40 mL trockenem THF vorgelegt. Über einen Zeitraum von 30 min wurden 4.2 mL (3.04 g, 30 mmol, 1.0 eq) Triethylamin über einen Tropftrichter zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 17 h bei RT gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat drei Mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde das Produkt als farbloses Öl in einer Ausbeute von 89 % (5.21 g, 26.67 mmol) erhalten.

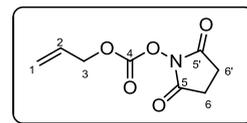
Summenformel: C₈H₉NO₅.

Molmasse: 199.16 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 222.1$ [M + Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.00$ -5.87 (m, 1 H, H-2), 5.42 (dq, $J = 17.2, 1.4$ Hz, 1 H, H-1), 5.35 (dq, $J = 10.4, 1.1$ Hz, 1 H, H-1), 4.76 (dt, $J = 5.9, 1.3$ Hz, 2 H, H-3), 2.81 (s, 4 H, H-6, H-6').

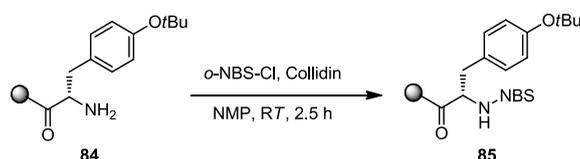
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 168.8$ (2 C, C-5, C-5'), 151.5 (1 C, C-4), 129.9 (1 C, C-2), 120.8 (1 C, C-1), 71.5 (1 C, C-3), 25.5 (2 C, C-6, C-6').



III.13. Versuchsdurchführungen zur SPPS

III.13.1. Festphasensynthese zur linearen Complestatin-Vorstufe

III.13.1.1. NBS-Schützung von Harz-gebundenem *O*-tert-Butyl-L-Tyr

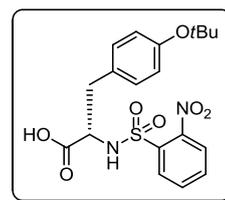


60 mg (0.27 mmol, 6.0 eq) *ortho*-Nitrobenzolsulfonylchlorid und 59 μL (55 mg, 0.45 mmol, 10.0 eq) 2,4,6-Collidin wurden in 1.5 mL NMP gelöst und zu 100 mg (0.05 mmol, 0.45 mmol/g, 1.0 eq) Harz-gebundenem *O*-tert-Butyl-L-tyrosin **84** hinzugefügt. Nachdem 2.5 h bei RT oder 1 h bei 26 bis 29 °C geschüttelt wurde, wurde filtriert und fünf Mal mit NMP gewaschen. Laut HPLC-Analyse fand quantitative Umsetzung zu **85** statt.

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$.

Molmasse: 422.45 g/mol.

ESI-MS (negativ): $m/z = 421.1 [\text{M} - \text{H}]^-$.

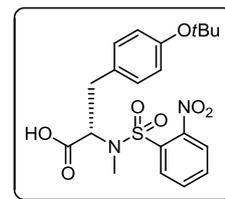


III.13.1.2. N-Methylierung des N-NBS-*O*-tert-butyl-L-Tyr

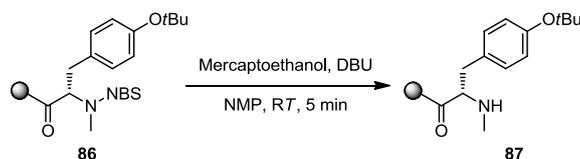


Eine Lösung aus 20 μL DBU (20.4 mg, 0.13 mmol, 3.0 eq) in 750 μL NMP wurden zu 99.4 mg (0.04 mmol, 1.0 eq) Harz-gebundenen *N*-NBS-*O*-tert-Bu-L-Tyr **85** gegeben und für 6 min bei RT geschüttelt. Dem folgend wurden 42 μL (56.4 mg, 0.45 mmol, 10.0 eq) Dimethylsulfat in 750 μL NMP gelöst zugegeben und 2 min bei RT geschüttelt. Das Harz wurde fünf Mal mit NMP gewaschen. Bei der Wiederholung wurde die Umsetzung mit DBU 3 min und nach der Dimethylsulfat-Zugabe 2 min geschüttelt. Die HPLC-Analyse zeigte nach der Wiederholung eine vollständige Umsetzung zu **86**.

Summenformel:	$C_{20}H_{24}N_2O_7S$.
Molmasse:	436.48 g/mol.
ESI-MS (positiv):	$m/z = 459.1 [M + Na]^+$.
ESI-MS (negativ):	$m/z = 435.1 [M - H]^-$.

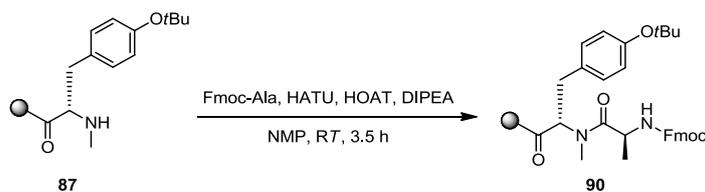


III.13.1.3. NBS Entschützung des *N*-Me-*N*-NBS-*O*-*tert*-butyl-*L*-Tyr



Mercaptoethanol (31 μ L, 34.5 mg, 0.44 mmol, 10.0 eq) und DBU (335 μ L, 33.6 mg, 0.22 mmol, 5.0 eq) wurden in 1.5 mL NMP gelöst und zum Harz-gebundenen *N*-Me-*N*-NBS-*O*-*tert*-Bu-*L*-Tyr **86** (98.5 mg, 0.04 mmol, 1.0 eq) gegeben und 5 min bei RT geschüttelt. Das Harz wurde filtriert und fünf Mal mit NMP und drei Mal mit DCM gewaschen. Laut HPLC-Untersuchung fand eine quantitative Entschützung zu **87** statt.

III.13.1.4. Peptidkettenverlängerung zum Dipeptid: *N*-Me-*O*-*tert*-Bu-*L*-Tyr-*N*-Fmoc-*L*-Ala (**90**)



440.0 μ L (6.75 μ mol, 3.0 eq) einer 15.2 mM *N*-Fmoc-*L*-Ala Lösung in NMP, 260.0 μ L (6.75 μ mol, 3.0 eq) einer 26.0 mM HATU Lösung in NMP, 280 μ L (6.75 μ mol, 3.0 eq) einer 24.5 mM HOAT Lösung in NMP und 2.4 μ L (1.7 mg, 13.5 μ mol, 6.0 eq) DIPEA wurden gut vermischt und zu 5 mg (2.25 μ mol, 1.0 eq) am Harz gebundenen *N*-Me-*O*-*tert*-Bu-*L*-Tyr **87** (0.45 mmol/g) gegeben und 3.5 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert, fünf Mal mit NMP und drei Mal mit DCM gewaschen. HPLC- und LC-MS-Analyse wiesen auf quantitative Produktbildung von **90** hin.

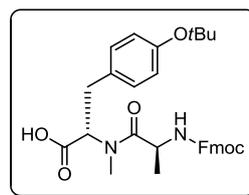
Summenformel:

 $C_{32}H_{36}N_2O_6$

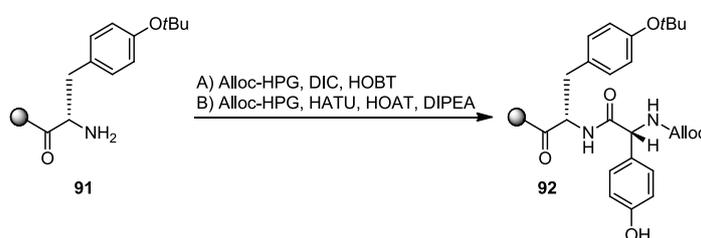
Molmasse:

544.64 g/mol.

LC-MS (ESI positiv):

 $m/z = 545.3 [M + H]^+$, $567.2 [M + Na]^+$, $1089.5 [2M + H]^+$, $1111.4 [2M + Na]^+$.

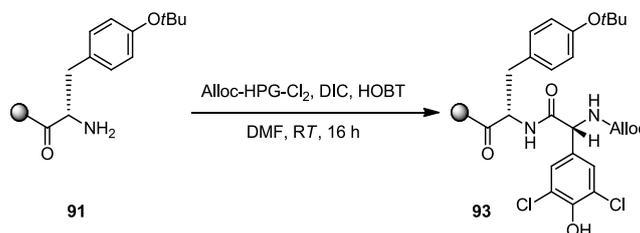
III.13.1.5. Peptidkettenverlängerung zum Dipeptid: *O*-tert-Bu-L-Tyr-N-Alloc-D-4-HPG (**92**)



Für die Kupplung von *N*-Alloc-D-4-HPG an *O*-tert-Bu-L-Tyr an der festen Phase wurden zwei Reaktionsbedingungen (A und B) erprobt. Unter beiden Bedingungen fand die Peptidkupplung zum Dipeptid **92** statt.

- A) 230.0 μ L (9.0 μ mol, 4.0 eq) einer 39.8 mM *N*-Alloc-D-4-HPG (**56**) Lösung in DMF, 1.22 mL (18.0 μ mol, 8.0 eq) einer 14.8 mM HOBT Lösung in DMF und 1.4 μ L (1.1 mg, 9.0 μ mol, 4.0 eq) DIC wurden gut vermischt und zu 5 mg (2.3 μ mol, 1.0 eq) am Harz gebundenen *O*-tert-Bu-L-Tyr (**91**) (0.45 mmol/g) gegeben und 44.5 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert und gewaschen. Die HPLC-Analyse wies auf Produktbildung von **92** hin.
- B) 170.0 μ L (6.75 μ mol, 3.0 eq) einer 39.8 mM *N*-Alloc-D-4-HPG (**56**) Lösung in NMP, 260.0 μ L (6.75 μ mol, 3.0 eq) einer 26.0 mM HATU in Lösung NMP, 280 μ L (6.75 μ mol, 3.0 eq) einer 24.5 mM HOAT in Lösung NMP und 2.4 μ L (1.7 mg, 13.5 μ mol, 6.0 eq) DIPEA wurden gut vermischt und zu 5 mg (2.25 μ mol, 1.0 eq) am Harz gebundenen *O*-tert-Bu-L-Tyr **91** (0.45 mmol/g) gegeben und 3.5 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert, fünf Mal mit NMP und drei Mal mit DCM gewaschen. Die HPLC-Analyse wies auf Produktbildung von **92** hin.

III.13.1.6. Peptidkettenverlängerung zum Dipeptid: *O*-*tert*-Bu-*L*-Tyr-*N*-Alloc-3,5-dichlor-*D*-4-HPG (**93**)

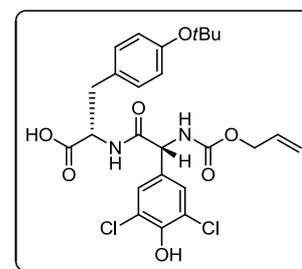


290.0 μL (9.0 μmol , 4.0 eq) einer 31.2 mM *N*-Alloc-3,5-dichlor-*D*-4-HPG (**58**) Lösung in DMF, 1.22 mL (18.0 μmol , 8.0 eq) einer 14.8 mM HOBT Lösung in DMF und 1.4 μL (1.1 mg, 9.0 μmol , 4.0 eq) DIC wurden gut vermischt und zu 5 mg (2.3 μmol , 1.0 eq) am Harz gebundenen *O*-*tert*-Bu-*L*-Tyr **91** (0.45 mmol/g) gegeben und 16 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert, fünf Mal mit NMP und drei Mal mit DCM gewaschen. Die HPLC- und LC-MS-Analyse zeigten Produktbildung von **93**.

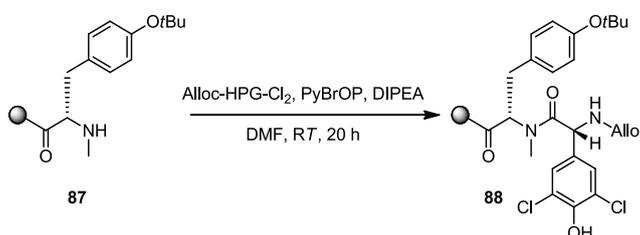
Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7$.

Molmasse: 539.41 g/mol.

LC-MS (ESI positiv): $m/z = 539.1 [\text{M} + \text{H}]^+$, $561.2 [\text{M} + \text{Na}]^+$.



III.13.1.7. Peptidkettenverlängerung zum Dipeptid: *N*-Me-*O*-*tert*-Bu-*L*-Tyr-*N*-Alloc-3,5-dichlor-*D*-4-HPG (**88**)

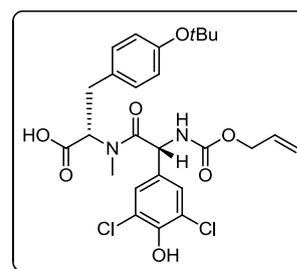


360.0 μL (11.25 μmol , 5.0 eq) einer 31.2 mM *N*-Alloc-3,5-Dichlor-*D*-4-HPG (**58**) Lösung in DMF, 640.0 μL (11.03 μmol , 4.9 eq) einer 17.2 mM PyBrOP Lösung in DMF und 3.9 μL (3 mg, 22.50 μmol , 10.0 eq) DIPEA wurden gut vermischt und zu 5 mg (2.25 μmol , 1.0 eq) am Harz gebundenen *N*-Me-*O*-*tert*-Bu-*L*-Tyr (**87**) (0.45 mmol/g) gegeben und 20 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert und gewaschen. Die HPLC- und LC-MS-Analyse zeigte Spuren der Produktbildung von **88**.

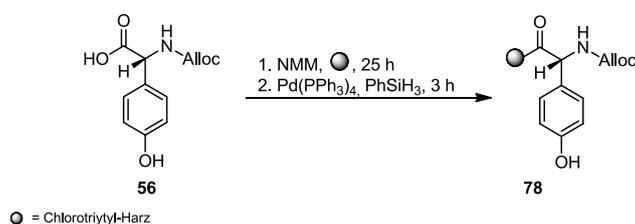
Summenformel: $C_{26}H_{30}Cl_2N_2O_7$

Molmasse: 553.43 g/mol.

LC-MS (ESI positiv): $m/z = 553.1 [M + H]^+$

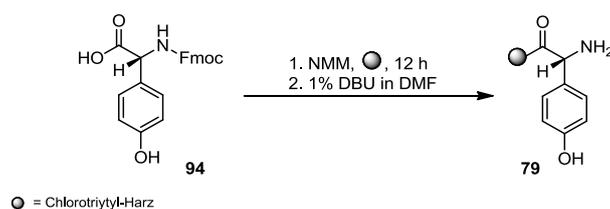


III.13.1.8. Beladen des 2-Chlortritylchlorid-Harzes mit N-Alloc-D-4-HPG



Das Beladen des 2-Chlortritylchlorid-Harzes erfolgte mit einer Ausbeute 53 % (99.4 mg, 0.40 mmol; dies entspricht der gewogenen Massen-Differenz und damit dem Gehalt an geladener Aminosäure). Dabei wurden 500 mg (0.75 mmol, 1.0 eq) des Harzes, welches ein Substitutionsvermögen von maximal 1.50 mmol/g aufwies, mit 377 mg (1.50 mmol, 2.0 eq) *N*-Alloc-D-4-HPG (**56**) und 210 μ L (190 mg, 1.88 mmol, 2.5 eq) NMM versetzt und 25 h bei RT geschüttelt.

III.13.1.9. Beladen des 2-Chlortritylchlorid-Harzes mit N-Fmoc-D-4-HPG

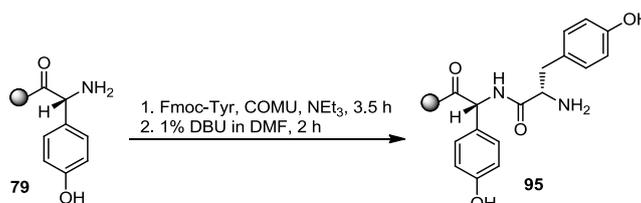


Das Beladen des 2-Chlortritylchlorid-Harzes erfolgte mit einer Ausbeute von 72 % (0.60 mmol/g, $A_{301nm} = 0.326$). Dabei wurden 1 g (0.84 mmol, 1.0 eq) des Harzes, welches ein Substitutionsvermögen von maximal 0.84 mmol/g aufwies, mit 941 mg (2.41 mmol, 2.8 eq) *N*-Fmoc-D-4-HPG und 292 μ L (269 mg, 2.66 mmol, 3.2 eq) NMM versetzt und 12 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und gewaschen.

Die folgende Fmoc-Entschützung wurde unter mildereren Bedingungen als mit 20 %igem Piperidin durchgeführt. Hierzu wurde der Reaktor mit Harz mit 1 %igem DBU in DMF befüllt und 5 min bei RT

geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und gewaschen. Da der Fmoc-Test ($A_{301\text{nm}} = 0.189$) noch Fmoc-geschützte Aminosäure zeigte, wurde der Versuch mit quantitativer Entschützung (Fmoc-Test: $A_{301\text{nm}} = 0.005$, HPLC) wiederholt, wobei die Reaktionszeit auf 30 min erhöht wurde.

III.13.1.10. Peptidkettenverlängerung zum Dipeptid: D-4-HPG-L-Tyr (95)

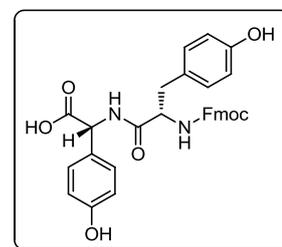


972 mg (2.41 mmol, 4.0 eq) Fmoc-L-Tyr (**106**), 1.03 g COMU (2.41 mmol, 4.0 eq) und 336 μL (244 mg, 2.41 mmol, 4.0 eq) Triethylamin wurden in 4 mL DMF gelöst und 2 min inkubiert. Die Reaktionslösung wurde anschließend zu 1 g (0.60 mmol, 1.0 eq) Harz-gebundenen D-4-HPG **79** gegeben, der Kolben wurde mit 1 mL DMF nachgespült und der Reaktor wurde 3.5 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde filtriert und gewaschen. Die HPLC und die ESI-MS-Analyse zeigten eine nahezu quantitative Umsetzung des Edukts in das gewünschte, N-Fmoc-geschützte Produkt **95** (Edukt nur noch in Spuren übrig).

Summenformel: $\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7$.

Molmasse: 552.57 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 553.0 [\text{M} + \text{H}]^+$, $575.0 [\text{M} + \text{Na}]^+$.

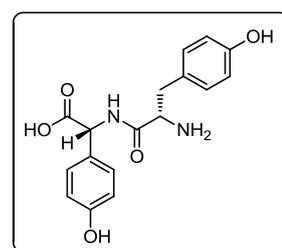


Die anschließende Fmoc-Entschützung wurde unter milderer Bedingungen als mit 20 %igem Piperidin durchgeführt. Hierzu wurde der Reaktor mit Harz mit 1 %iges DBU in DMF gefüllt 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und gewaschen. Die HPLC-Untersuchung ergab eine vollständige Umsetzung des Edukts in das freie Dipeptid **95**.

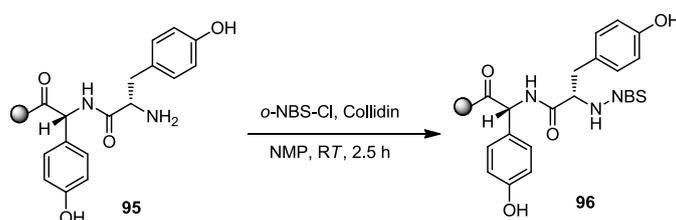
Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$.

Molmasse: 330.34 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 331.0 [\text{M} + \text{H}]^+$.



III.13.1.11. NBS-Schützung des Dipeptids: *D*-4-HPG-*N*-NBS-*L*-Tyr (**96**)

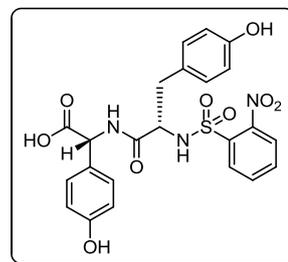


267 mg (1.20 mmol, 4.0 eq) *ortho*-Nitrobenzolsulfonylchlorid und 397 μ L (365 mg, 3.01 mmol, 10.0 eq) 2,4,6-Collidin wurden in 7 mL NMP gelöst und zu 500 mg (0.30 mmol, 1.0 eq) Harz-gebundenen Dipeptid **95** hinzugefügt. Nachdem 2.5 h bei RT geschüttelt wurde, wurde filtriert und gewaschen. Laut HPLC-Analyse hat eine quantitative Umsetzung zu **96** stattgefunden.

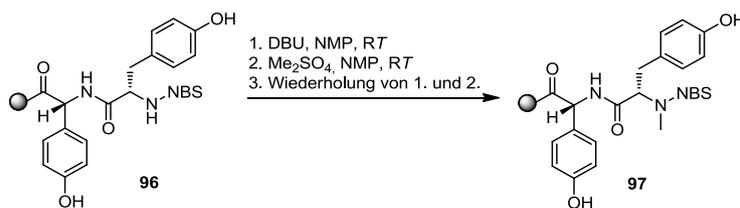
Summenformel: $C_{23}H_{21}N_3O_9S$.

Molmasse: 515.49 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 537.2 [M + Na]^+$.



III.13.1.12. *N*-Methylierung des *N*-NBS-geschützten Dipeptids: *D*-4-HPG-*N*-Me-*N*-NBS-*L*-Tyr (**97**)

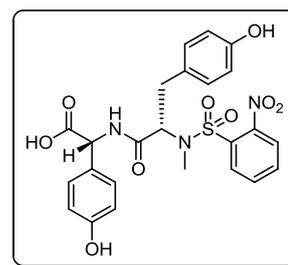


Eine Lösung aus 135 μ L (138 mg, 0.90 mmol, 3.0 eq) in 3 mL NMP wurden zu 500 mg (0.30 mmol, 1.0 eq) Harz-gebundenen NBS-geschützten Dipeptid **96** gegeben und für 3 min bei RT geschüttelt. Dem folgend wurden 285 μ L (380 mg, 3.01 mmol, 10.0 eq) Dimethylsulfat in 3 mL NMP gelöst zugegeben und 2 min bei RT geschüttelt. Das Harz wurde filtriert und gewaschen. Da die HPLC-Reaktionskontrolle noch viel Edukt **96** aufwies, wurde bei der Wiederholung die Umsetzung mit DBU 6 min und nach der Dimethylsulfat-Zugabe 4 min geschüttelt. Es folgte eine zweite Wiederholung, bei der die 1. Reaktion 12 min und die 2. Reaktion 8 min dauerte. Nach der dritten Wiederholung mit Reaktionszeiten von 6 und 4 min zeigte die HPLC-Analyse eine nahezu quantitative Umsetzung des Edukts zu **97** (Edukt nur noch in Spuren übrig).

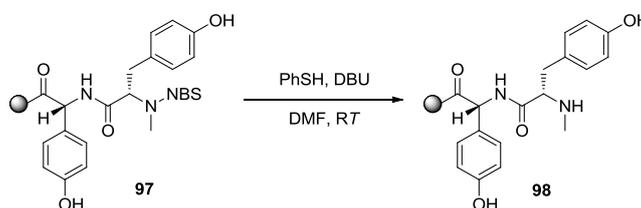
Summenformel: $C_{24}H_{23}N_3O_9S$.

Molmasse: 529.52 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 552.0 [M + Na]^+$.



III.13.1.13. N-NBS-Entschützung des N-methylierten Dipeptids: D-4-HPG-N-Me-L-Tyr (**98**)

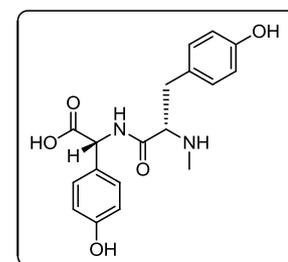


Unter Argon-Atmosphäre wurden Thiophenol (307 μ L, 332 mg, 3.01 mmol, 10.0 eq) und DBU (225 μ L, 229 mg, 1.51 mmol, 5.0 eq) in 6 mL DMF gelöst und zu 500 mg (0.30 mmol, 1.0 eq) Harzgebundenen, NBS-geschützten Dipeptid **97** gegeben und 30 min bei RT geschüttelt. Der Versuch wurde mit einer Reaktionszeit von 50 min wiederholt, um quantitativ **98** zu erhalten.

Summenformel: $C_{18}H_{20}N_2O_5$.

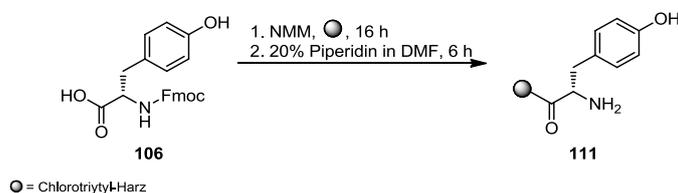
Molmasse: 344.36 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 345.2 [M + H]^+$, $367.1 [M + Na]^+$.



III.13.2. Festphasensynthese der linearen Arylomycin-Vorstufe

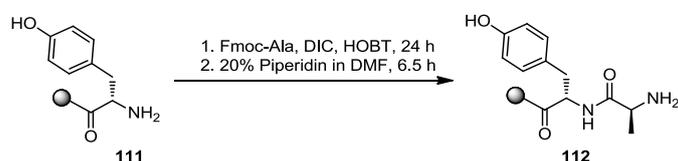
III.13.2.1. Beladen des 2-Chlortritylchlorid-Harzes mit *N*-Fmoc-L-Tyr (**111**)



Das Beladen des 2-Chlortritylchlorid-Harzes erfolgte mit einer Ausbeute von 39 % (0.33 mmol/g, $A_{301\text{nm}} = 0.242$). Dabei wurden 3 g (2.52 mmol, 1.0 eq) des Harzes, welches ein Substitutionsvermögen von maximal 0.84 mmol/g aufwies, nach dem Aktivieren mit 3.05 g (7.56 mmol, 3.0 eq) *N*-Fmoc-L-Tyr (**106**) und 887 μL (816 mg, 8.06 mmol, 3.2 eq) NMM versetzt und 16 h bei RT geschüttelt.

Die anschließende Fmoc-Entschützung verlief laut HPLC-Analyse und Fmoc-Test ($A_{301\text{nm}} = 0.001$) quantitativ.

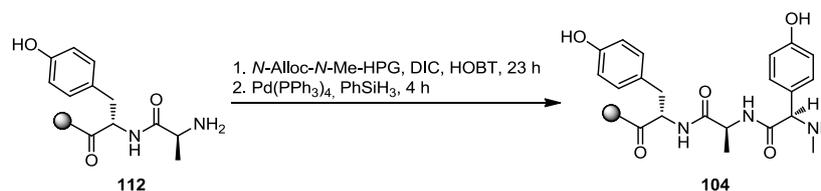
III.13.2.2. Peptidkettenverlängerung zum Dipeptid: *L*-Tyr-*L*-Ala (**112**)



644 mg (1.96 mmol, 4.0 eq) *N*-Fmoc-L-Alanin (**89**) wurden mit Hilfe von 310 μL (247 mg, 1.96 mmol, 4.0 eq) DIC und 529 mg (3.91 mmol, 8.0 eq) HOBT an 1.5 g (0.49 mmol, 1.0 eq) Harz-gebundenen *L*-Tyrosin (**111**) in 24 h gekuppelt. Kaiser-Test und HPLC-Analyse zeigten eine vollständige Umsetzung zu **112** an.

Die anschließende Fmoc-Entschützung verlief laut HPLC-Analyse und Fmoc-Test ($A_{301\text{nm}} = 0.003$) quantitativ.

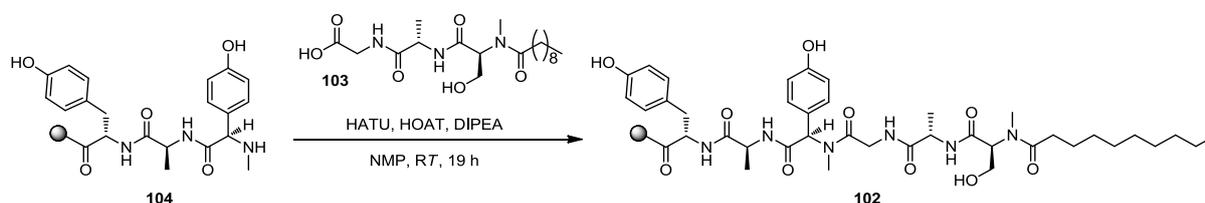
III.13.2.3. Peptidkettenverlängerung zum Tripeptid: *L*-Tyr-*L*-Ala-*N*-Me-*D*-4-HPG (104)



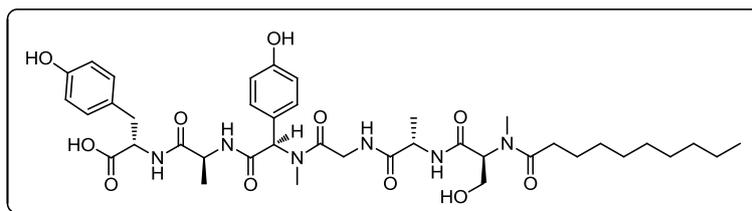
519 mg (1.96 mmol, 4.0 eq) *N*-Alloc-*N*-Me-*D*-4-HPG (**105**) wurden mit Hilfe von 310 μ L (247 mg, 1.96 mmol, 4.0 eq) DIC und 529 mg (3.91 mmol, 8.0 eq) HOBT an 1.5 g (0.49 mmol, 1.0 eq) des Harzgebundenen Dipeptids **112** in 23 h gekuppelt. Kaiser-Test und HPLC-Analyse zeigten eine vollständige Umsetzung zu **104** an.

Die anschließende Alloc-Entschützung verlief laut HPLC-Analyse quantitativ.

III.13.2.4. Kupplung des Tripeptids mit dem Fettsäurerest zur linearen Arylomycin-Derivat-Vorstufe (102)



301 mg (0.098 mmol, 1.0 eq) an Harz gebundenes Tripeptid **104** wurden mit einer Lösung aus 47 mg (0.120 mmol, 1.1 eq) Fettsäurerest **103**, 112 mg (0.290 mmol, 3.0 eq) HATU, 40 mg (0.290 mmol, 3.0 eq) HOAT und 102 μ L (76 mg, 0.590 mmol, 6.0 eq) DIPEA in 2.7 mL NMP versetzt und 19 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde filtriert und zunächst fünf Mal mit NMP gewaschen. Anschließend wurde das Harz nochmal wie oben beschrieben (vgl. Kapitel 19.) gewaschen und die lineare Arylomycin-Typ-Peptidkette **102** vom Harz gespalten. Nach der Isolierung via semi-präparative HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-25 min 90% B, 25-28 min 10% B, 28-38 min 5 % B; Säule: Eurospher II 100 RP C-18, 5 μ m, 250 x 16 mm mit Vorsäule: 30 x 16 mm der Fa. *Knauer*) wurde die gewünschte Peptidkette **102-OH** in einer Ausbeute von 15 % (12mg, 0.015 mmol) erhalten.



Summenformel: $C_{40}H_{58}N_6O_{11}$.

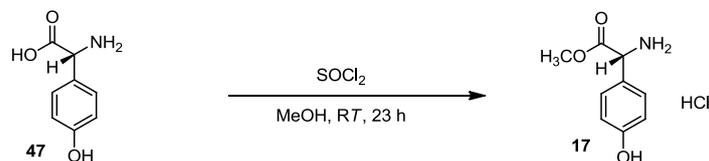
Molmasse: 798.92 g/mol.

LC-MS (ESI positiv): $m/z = 799.5 [M + H]^+$, $821.5 [M + Na]^+$.

1H -NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.15$ (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, Ar-H), 7.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, Ar-H), 5.97 (s, 1 H, $C\alpha$ -H-HPG), 4.54 (m, 7 H, $C\alpha$ -H-Tyr, CH_2 -Ser, CH_2 -Gly), 4.36 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $C\alpha$ -H-Ala), 4.14 (m, 3 H, H-Ala), 3.12 (dd, $J = 13.9$, 5.4 Hz, 1 H, CH_2 -Tyr), 2.95 (dd, $J = 13.9$, 8.4 Hz, 1 H, CH_2 -Tyr), 2.77 (s, 3 H, *N*-Me), 2.73 (s, 3 H, *N*-Me), 2.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, C=O- CH_2), 1.57 (p, $J = 7.4$ Hz, 2 H, CH_3 - CH_2), 1.44 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H, CH_3 -Ala), 1.25 (m, 18 H, Alkylkette), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3 H, Alkylkette- CH_3).

III.14. Synthesevorschriften zur LPPS

III.14.1. D-4-HPG-Methylester · HCl¹³³ (17)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 5.0 g (29.91 mmol, 1.0 eq) D-4-HPG (**47**) in einem 250 mL-Schlenkkolben in 90 mL trockenem MeOH (3 mL/mmol) suspendiert. 3.91 mL (6.4 g, 53.84 mmol, 1.8 eq) Thionylchlorid wurden tropfenweise zugegeben. Nach 23 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand zweimal mit Et₂O gewaschen. Der D-4-Hydroxyphenylglycinmethylester (**17**) wurde als das Hydrochlorid-Salz in quantitativer Ausbeute (6.5 g, 30.00 mmol) als weißes Pulver erhalten.

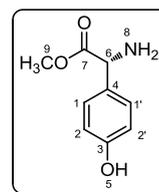
Summenformel: C₉H₁₁NO₃.

Molmasse: 181.19 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 182.1 [M + H]^+$, 204.1 $[M + Na]^+$, 363.2 $[2M + H]^+$.

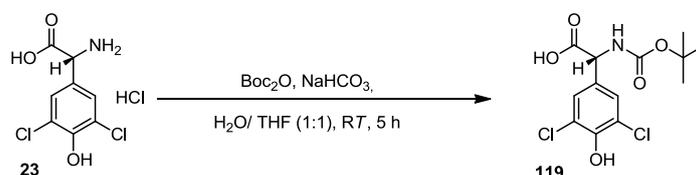
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 9.98$ (s, 1 H, H-5), 8.99 (br, 2 H, H-8), 7.28 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 5.08 (s, 1 H, H-6), 3.69 (s, 3H, H-9).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 169.2$ (1 C, C-7), 158.6 (1 C, C-3), 129.6 (2 C, C-1, C-1'), 122.6 (1 C, C-4), 115.7 (2 C, C-2, C-2'), 54.9 (1 C, C-6), 53.0 (1 C, C-9).



Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹³³

III.14.2. N-tert-Butyloxycarbonyl-3,5-dichlor-D-4-hydroxyphenylglycin (113)



In einem Lösungsmittelgemisch aus THF und dest. H₂O in einem Verhältnis von 1:1 (insgesamt 160 mL) wurden 1.51 g (5.54 mmol, 1.0 eq) 3,5-Dichlor-D-4-hydroxyphenylglycin (**23**) Hydrochlorid, 1.86 g (22.15 mmol, 4.0 eq) NaHCO₃ und 2.42 g (11.08 mmol, 2.0 eq) Di-*tert*-butyldicarbonat gemischt und bei RT 5 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 M NaHSO₄ (15 mL, bis pH = 1 - 3) gequenchet. Nachdem THF evaporiert wurde, wurde die wässrige Phase drei Mal in EtOAc extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (Eluentengradient: Pentan/Aceton, 2:1 bis 1:7, 0:1, MeOH; R_f(Pentan/Aceton, 2:1) = 0.27 oder DCM/MeOH/Aceton, 4:1:1, 1:1:1, Aceton, MeOH; R_f(DCM/MeOH/Aceton, 4:1:1) = 0.49). Das reine Produkt **119** wurde als ein weißer Schaum in einer Ausbeute von 83 % (1,54 g, 4.58 mmol) isoliert.

Summenformel:

C₁₃H₁₅Cl₂NO₅.

Molmasse:

336.17 g/mol.

ESI-MS (negativ):

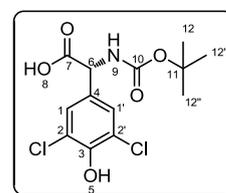
$m/z = 334.1 [M - H]^-$.

ESI-MS (positiv):

$m/z = 358.0 [M + Na]^+$, $695.0 [2M + Na]^+$, $1030.0 [M + Na]^+$.

EI (70 eV) m/z (%):

290.0 (4), 278.9 (12), 260.9 (24), 233.9 (45) [M - Boc]⁺, 189.9 (67), 57.1 (100) [*tert*-Bu - H]⁻.

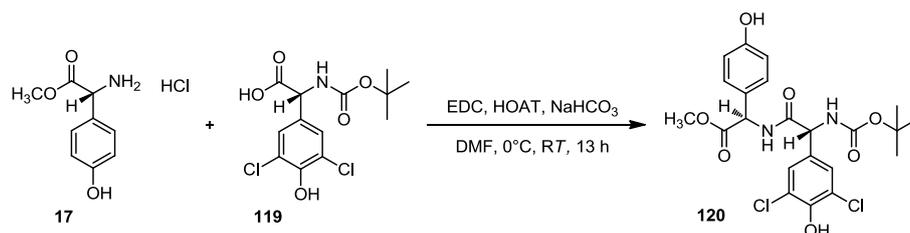


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 10.22$ (s, 1 H, H-5), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, H-9), 7.41 (s, 2 H, H-1, H-1'), 5.06 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, H-6), 1.38 (s, 9 H, H-12, H-12', H-12'').

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 171.8$ (1 C, C-7), 155.1 (1 C, C-10), 148.6 (1 C, C-3), 130.4 (1 C, C-4), 128.0 (2 C, C-1, C-1'), 122.0 (2 C, C-2, C-2'), 78.5 (1 C, C-11), 56.1 (1 C, C-6), 28.2 (3 C, C-12, C-12', C-12'').

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.⁶⁴

III.14.3. MeO-D-HPG-D-HPG-Cl₂-Boc (120)



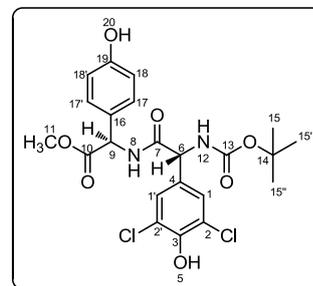
Zu einer Lösung aus 532 mg (1.58 mmol, 1.1 eq) *N*-Boc-3,5-Dichlor-D-4-HPG (**119**) in 15 mL DMF (10 mL/mmol) wurde unter Eisbadkühlung 313 mg (1.44 mmol, 1.0 eq) D-4-HPG-OMe (**17**), 294 mg (2.16 mmol, 1.5 eq) HOAT, 414 mg (2.16 mmol, 1.5 eq) EDC · HCl und 121 mg (1.44 mmol, 1.0 eq) NaHCO₃ gegeben und bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde nach 13 h mit EtOAc verdünnt und ein Mal mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EtOAc re-extrahiert und die kombinierten EtOAc-Phasen wurden sieben Mal (bis die NaHCO₃-Phase nur noch schwach rosa war) mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum entstand ein roter Schaum. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (Pentan/Aceton 1:1, R_f = 0.80) führte zu 612 mg (1.23 mmol) reinen Produkts **120** als einen gelben Schaum. Dies entspricht einer Ausbeute von 85 %.

Summenformel: C₂₂H₂₄Cl₂N₂O₇.

Molmasse: 499.34 g/mol.

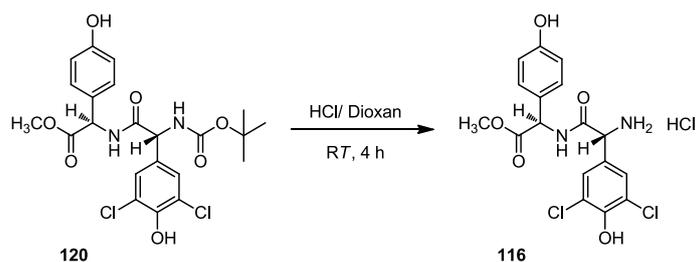
HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 499.1028$ [M + H]⁺ ($m/z = 499.1039$ [M + H]⁺ berechnet für C₂₂H₂₅Cl₂N₂O₇), 521.0848 [M + Na]⁺ ($m/z = 521.0858$ [M + Na]⁺ berechnet für C₂₂H₂₄Cl₂N₂NaO₇), 999.1945 [2M + H]⁺ ($m/z = 999.1970$ [2M + H]⁺ berechnet für C₄₄H₄₉Cl₄N₄O₁₄).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.11 (br, 1 H, H-20), 9.58 (br, 1 H, H-5), 8.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, H-8), 7.44 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, H-12), 7.42 (s, 2 H, H-1, H-1'), 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-17, H-17'), 6.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-18, H-18'), 5.27 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, H-6), 5.24 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, H-9), 3.54 (s, 3 H, H-11), 1.36 (s, 9 H, H-15, H-15', H-15'').



¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ= 170.9 (1 C, C-10), 169.3 (1 C, C-7), 157.6 (1 C, C-19), 154.8 (1 C, C-13), 148.3 (1 C, C-3), 131.4 (1 C, C-4), 129.1 (2 C, C-17, C-17'), 127.5 (2 C, C-1, C-1'), 125.8 (1 C, C-16), 121.8 (2 C, C-2, C-2'), 115.4 (2 C, C-18, C-18'), 78.5 (1 C, C-14) 56.0 (1 C, C-6), 55.6 (1 C, C-9), 52.1 (1 C, C-11), 28.1 (3 C, C-15, C-15', C-15'').

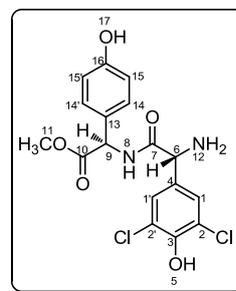
III.14.4. MeO-D-HPG-D-HPG-Cl₂-NH₂ (116)



720 mg (1.44 mmol, 1.0 eq) des Dipeptids **120** wurde mit 7.21 mL (28.84 mmol, 20.0 eq) 4 N HCl in Dioxan bei 0 °C versetzt und 4 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde unter Eisbadkühlung mit dest. Wasser verdünnt und überschüssiges HCl und Dioxan wurden unter vermindertem Druck entfernt. Das Entfernen des Wassers erfolgte über Gefriertrocknung. Das *N*-entschützte Dipeptid **116** wurde als ein weißes Pulver in quantitativer Ausbeute (627 mg, 1.44 mmol) erhalten.

Summenformel: C₁₇H₁₆Cl₂N₂O₅.

Molmasse: 399.23 g/mol.

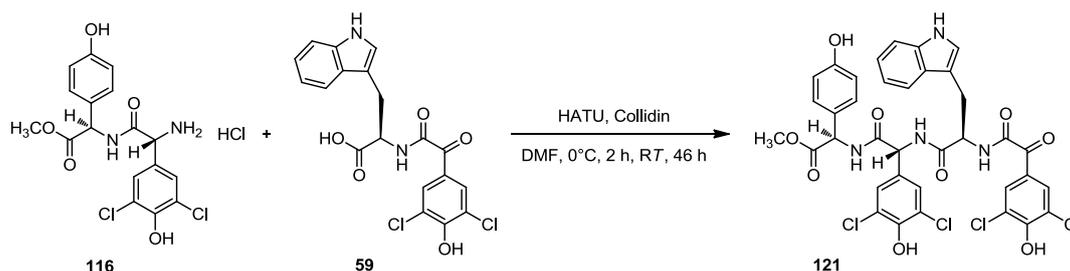


HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 399.0506$ [M + H]⁺ ($m/z = 399.0515$ [M + H]⁺ berechnet für C₁₇H₁₇Cl₂N₂O₅), 799.0920 [2M + H]⁺ ($m/z = 799.0921$ [2M + H]⁺ berechnet für C₃₄H₃₃Cl₄N₄O₁₀).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ= 10.67 (br, 1 H, H-17), 9.71 (br, 1 H, H-5), 9.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 1 H, H-8), 8.64 (br, 2 H, H-12), 7.51 (s, 2 H, H-1, H-1'), 7.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-14, H-14'), 6.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-15, H-15'), 5.30 (d, *J* = 6.3 Hz, 1 H, H-9), 4.97 (s, 1 H, H-6), 3.57 (s, 3 H, H-11).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ= 170.5 (1 C, C-10), 166.6 (1 C, C-7), 157.8 (1 C, C-16), 149.9 (1 C, C-3), 129.2 (2 C, C-15, C-15'), 128.6 (2 C, C-1, C-1'), 126.1 (1 C, C-4), 125.3 (1 C, C-13), 122.1 (2 C, C-2, C-2'), 115.5 (2 C, C-14, C-14'), 56.2 (1 C, C-6), 53.8 (1 C, C-9), 52.3 (1 C, C-11).

III.14.5. MeO-D-HPG-D-HPG-Cl₂-D-Trp-(2-(HP-Cl₂)-2-oxoessigsäure) (121)



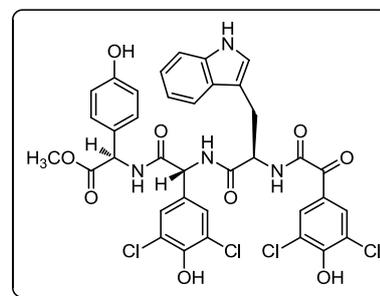
Zu einer Lösung aus 444 mg (1.02 mmol, 1.0 eq) des freien Dipeptids **116** und 473 mg (1.12 mmol, 1.1 eq) des *N*-(2-(3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-oxoaceto)-*D*-tryptophanmethylesters (**59**) in 12 mL DMF (10 mL/ mmol) wurden 426 mg (1.12 mmol, 1.1 eq) HATU und 676 μ L (618 mg, 5.1 mmol, 5.0 eq) Collidin unter Eisbadkühlung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0 °C und 46 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit EtOAc verdünnt und mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EtOAc reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in Pentan resuspendiert und im Vakuum getrocknet. Eine Reinigung mittels MPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-1.8 min 95% A, 1.8-31.8 min 5% A, 31.8-34.4 min 5 % A; Säule: Reveleris[®] C18 40g; Flussrate: 40 mL/min) lieferte das gewünschte Produkt **121** als ein rosa Pulver in einer Ausbeute von 85 % (695 mg, 0.87 mmol).

Summenformel:



Molmasse:

802.44 g/mol.



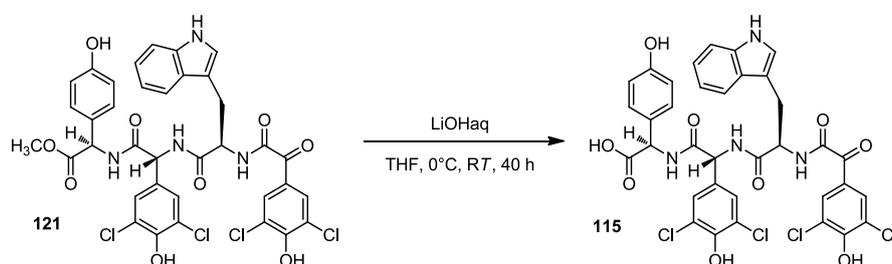
HR-ESI-MS (positiv):

$m/z = 803.0648$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($m/z = 803.0659$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{29}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{O}_9$), 1605.1289 $[2\text{M} + \text{H}]^+$ ($m/z = 1605.1240$ $[2\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{72}\text{H}_{57}\text{Cl}_8\text{N}_8\text{O}_{18}$).

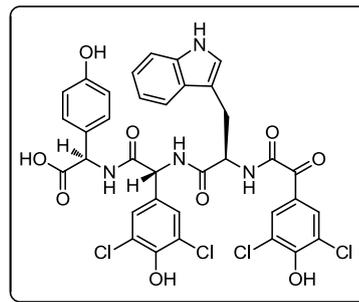
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 10.83$ (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, Indol-NH), 10.18 (br, 1 H, Ar-OH), 9.61 (br, 1 H, Ar-OH), 9.07 (d, $J = 6.4$ Hz, 1 H, NH), 8.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, NH), 8.94 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH), 7.76 (s, 2 H, Ar-H), 7.67 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, Trp-H), 7.49 (s, 2 H, Ar-H), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, Trp-H), 7.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 7.16 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, Indol-N-CH), 7.03 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 7.0 Hz, 1.2 Hz, 1 H, Trp-H), 6.92 (ddd, $J = 8.0$ Hz, 7.0 Hz, 1.1 Hz, 1 H, Trp-H), 6.79 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 5.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, C α -H), 5.29 (d, $J = 6.4$ Hz, 1 H, C α -H), 4.87 (ddd, $J = 9.9$ Hz, 8.0 Hz, 4.4 Hz, 1 H, C α -H), 3.57 (s, 3 H, OCH₃), 3.20 (dd, $J = 14.7$ Hz, 4.3 Hz, 1 H, CH₂), 3.06 (dd, $J = 9.9$ Hz, 4.8 Hz, 1 H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 186.0 (1 C, Cq, C=O), 170.9 (1 C, Cq, C=O), 170.5 (1 C, Cq, C=O), 168.9 (1 C, Cq, C=O), 163.9 (1 C, Cq, C=O), 157.7 (1 C, Cq, HO-C-Ar), 154.5 (1 C, Cq, HO-C-Ar), 148.4 (1 C, Cq, HO-C-Ar), 136.0 (1 C, Cq, C-Indol), 131.0 (1 C, Cq, C-Indol), 130.4 (2 C, CH, C-Ar), 129.2 (2 C, CH, C-Ar), 127.4 (2 C, CH, C-Ar), 127.2 (1 C, Cq, C-Ar), 125.50 (1 C, Cq, C-Ar), 125.45 (1 C, Cq, C-Ar), 123.9 (1 C, CH, CH-Indol), 122.2 (2 C, Cq, C-ArCl₂), 122.0 (2 C, Cq, C-ArCl₂), 120.9 (1 C, CH, C-Indol), 118.6 (1 C, CH, C-Indol), 118.2 (1 C, CH, C-Indol), 115.4 (2 C, CH, C-Ar), 111.4 (1 C, CH, C-Indol), 109.4 (1 C, Cq, C-Indol), 56.1 (1 C, CH, C α), 54.1 (1 C, CH, C α), 53.2 (1 C, CH, C α), 52.1 (1 C, CH₃, OCH₃), 27.7 (1 C, CH₂).

III.14.6. HO-D-HPG-D-HPG-Cl₂-D-Trp-(2-(HP-Cl₂))-2-oxoessigsäure (115)



In einem 500 mL-Rundkolben wurden 690 mg (0.86 mmol, 1.0 eq) des Tetrapeptid-Methylesters **121** in 3 mL abs. THF gelöst. 26 mL (2.58 mmol, 3.0 eq) einer 0.1 N LiOH-Lösung (aq) wurden bei 0 °C über einen Zeitraum von 40 min tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und 40 h gerührt. Nachdem THF unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde die basische wässrige Phase zwei Mal mit Et₂O gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mittels 10 %iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 1 bis 2 eingestellt und zwei Mal mit Et₂O extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Extraktion wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das freie Tetrapeptid **115** als ein dunkel-gelbes Pulver in einer Ausbeute von 91 % (615 mg, 0.78 mmol).



Summenformel: $C_{35}H_{26}Cl_4N_4O_9$.

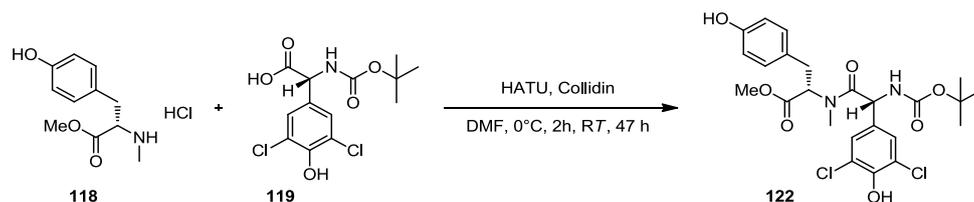
Molmasse: 788.41 g/mol.

HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 789.0489$ $[M + H]^+$ ($m/z = 789.0503$ $[M + H]^+$ berechnet für $C_{35}H_{27}Cl_4N_4O_9$), 811.0307 $[M + Na]^+$ ($m/z = 811.0322$ $[M + Na]^+$ berechnet für $C_{35}H_{26}Cl_4N_4NaO_9$).

HR-ESI-MS (negativ): $m/z = 787.0332$ $[M - H]^-$ ($m/z = 787.0346$ $[M - H]^-$ berechnet für $C_{35}H_{25}Cl_4N_4O_9$).

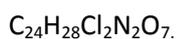
1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.84$ (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, Indol-NH), 10.16 (br, 1 H, Ar-OH), 9.00 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, NH), 8.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, NH), 7.75 (s, 2 H, Ar-H), 7.67 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, Trp-H), 7.51 (s, 2 H, Ar-H), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, Trp-H), 7.22 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 7.15 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, Indol-N-CH), 7.03 (t, $J = 7.1$ Hz, 1 H, Trp-H), 6.91 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, Trp-H), 6.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 5.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, C α -H), 5.20 (d, $J = 6.8$ Hz, 1 H, C α -H), 4.86 (ddd, $J = 9.3$ Hz, 4.3 Hz, 2.8 Hz, 1 H, C α -H), 3.19 (dd, $J = 14.7$ Hz, 4.3 Hz, 1 H, CH $_2$), 3.04 (dd, $J = 14.7$ Hz, 9.9 Hz, 1 H, CH $_2$).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 186.0$ (1 C, Cq, C=O), 172.0 (1 C, Cq, C=O), 170.4 (1 C, Cq, C=O), 168.7 (1 C, Cq, C=O), 164.9 (1 C, Cq, C=O), 157.4 (1 C, Cq, HO-C-Ar), 154.5 (1 C, Cq, HO-C-Ar), 148.4 (1 C, Cq, HO-C-Ar), 136.1 (1 C, Cq, C-Indol), 131.3 (1 C, Cq, C-Indol), 130.4 (2 C, CH, C-Ar), 129.1 (2 C, CH, C-Ar), 127.4 (2 C, CH, C-Ar), 127.2 (1 C, Cq, C-Ar), 126.4 (1 C, Cq, C-Ar), 125.5 (1 C, Cq, C-Ar), 124.0 (1 C, CH, CH-Indol), 122.2 (2 C, Cq, C-ArCl $_2$), 121.9 (2 C, Cq, C-ArCl $_2$), 120.9 (1 C, CH, C-Indol), 118.6 (1 C, CH, C-Indol), 118.2 (1 C, CH, C-Indol), 115.3 (2 C, CH, C-Ar), 111.4 (1 C, CH, C-Indol), 109.5 (1 C, Cq, C-Indol), 56.1 (1 C, CH, C α), 54.2 (1 C, CH, C α), 53.3 (1 C, CH, C α), 27.7 (1 C, CH $_2$).

III.14.7. MeO-Me-L-Tyr-D-HPG-Cl₂-Boc (122)

400 mg (1.63 mmol, 1.0 eq) *N*-Me-L-Tyrosinmethylester Hydrochlorid (**118**) und 602 mg (1.79 mmol, 1.1 eq) *N*-Boc-3,5-Dichlor-D-4-HPG (**119**) wurden in 10 mL DMF, 5 mL THF und 5 mL DCM (insgesamt 12 mL/mmol) gelöst. Bei 0 °C wurden 681 mg (1.79 mmol, 1.1 eq) HATU und 1.1 mL (988 mg, 8.15 mmol, 5.0 eq) 2,4,6-Collidin zugegeben. Nachdem 2 h bei dieser Temperatur gerührt wurde, verlief die Reaktion weitere 47 h bei RT. Die Reaktionsmischung wurde mit 80 mL EtOAc verdünnt und ein bis drei Mal mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EtOAc re-extrahiert und die kombinierten EtOAc-Phasen wurden drei Mal mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Die erhaltene organische Lösung wurde aufkonzentriert und zwei Mal in Pentan resuspendiert. Durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum entstand ein gelbes Öl. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/Aceton 4:1:1, R_f = 1.00 oder Pentan/Aceton 2:1 bis 1:2, R_f(2:1) = 0.41) führte zu 744 mg (1.41 mmol) reinen Produkts **122** als ein braunes Öl. Dies entspricht einer Ausbeute von 87 %.

Summenformel:

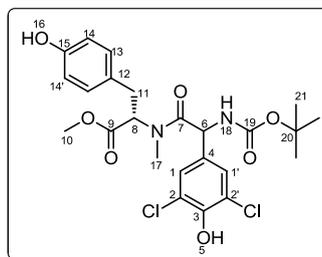


Molmasse:

527.39 g/mol.

HR-ESI-MS (positiv):

$m/z = 527.1339$ [M + H]⁺ ($m/z = 527.1352$ [M + H]⁺ berechnet für C₂₄H₂₈Cl₂N₂O₇), 549.1161 [M + Na]⁺, ($m/z = 549.1171$ [M + Na]⁺ berechnet für C₂₄H₂₈Cl₂N₂NaO₇), 1053.2573 [2M + H]⁺ ($m/z = 1055.2596$ [2M + H]⁺ berechnet für C₄₈H₅₇Cl₄N₄O₁₄).

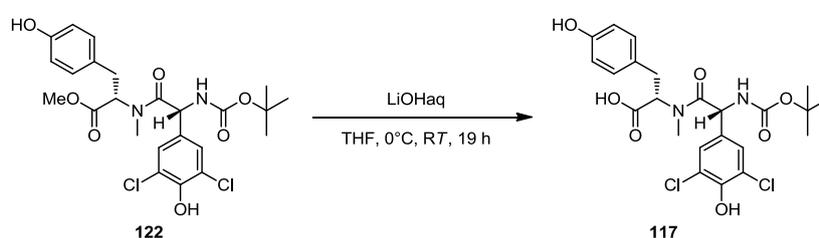


¹H-NMR (276 K, 400 MHz, MeOD-d₄): δ = 7.18 (s, 2 H, H-1, H-1'), 7.12 (t, *J* = 4.2 Hz, 1 H, H-18), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-13, H-13'), 6.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-14, H-14'), 5.37 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, H-6), 4.49 (dd, *J* = 11.3, 4.5 Hz, 1 H, H-8), 3.74 (s, 3 H, H-11), 3.11-3.05 (m, 1 H, H-11), 2.99-2.92 (m, 1 H, H-11), 2.66 (s, 3 H, H-17), 1.46 (s, 9 H, H-21).

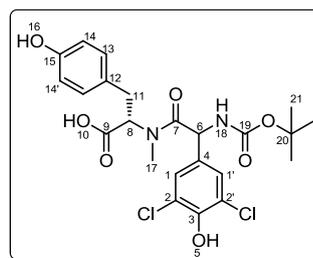
¹³C NMR (276 K, 100 MHz, MeOD-d₄): δ = 172.2 (1 C, Cq, C-7), 172.0 (1 C, Cq, C-9), 157.2 (1 C, Cq, C-15), 157.1 (1 C, Cq, C-19), 151.8 (1 C, Cq, C-3), 131.1 (2 C, CH, C-13, C-13'), 130.2 (1 C, Cq, C-4), 129.3 (2 C, CH, C-1, C-1'), 129.1 (1 C, Cq, C-12), 123.3 (2 C, Cq, C-2, C-2'), 116.3 (2 C, CH, C-14, C-14'), 80.8 (1 C, Cq, C-20), 64.4 (1 C, CH, C-8), 55.5 (1 C, CH, C-6), 52.7 (1 C, CH₃, C-10), 36.5 (1 C, CH₃, C-17), 34.4 (1 C, CH₂, C-11), 28.7 (3 C, C-21).

Die NMR-Spektren weisen Signale von zwei Rotationsisomeren auf. Aufgelistet sind die Signale des Hauptisomers.

III.14.8. HO-N-Me-L-Tyr-D-HPG-Cl₂-Boc (117)



In einem 100 mL-Rundkolben wurden 744 mg (1.41 mmol, 1.0 eq) des Dipeptids **122** in einem Minimum THF (4 mL) gelöst. 42 mL (4.23 mmol, 3.0 eq) einer 0.1 N LiOH-Lösung (aq) wurden bei 0 °C über einen Zeitraum von 40 min tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und 19 h gerührt. Nachdem THF unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde die basische wässrige Phase zwei Mal mit Et₂O gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mittels 10 %iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 1 bis 2 eingestellt und zwei Mal mit Et₂O extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Extraktion wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das C-entschützte Dipeptid **117** als gelben Schaum in quantitativer Ausbeute (725 mg, 1.41 mmol).



Summenformel: $C_{23}H_{26}Cl_2N_2O_7$.

Molmasse: 513.37 g/mol.

HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 513.1183$ $[M + H]^+$ ($m/z = 513.1195$ $[M + H]^+$ berechnet für $C_{23}H_{27}Cl_2N_2O_7$), 1027.2258 $[2M + H]^+$. ($m/z = 1027.2283$ $[2M + H]^+$ berechnet für $C_{46}H_{53}Cl_4N_4O_{14}$).

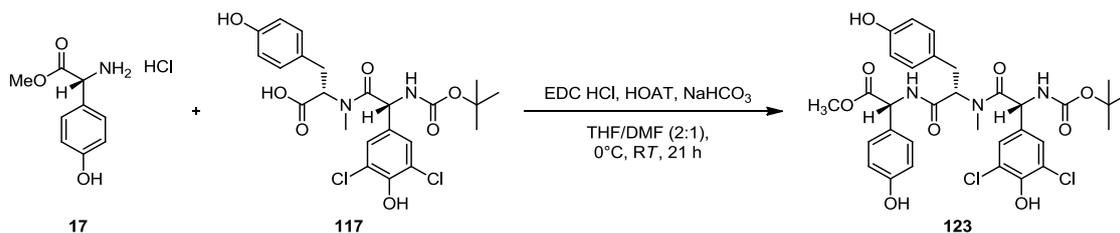
HR-ESI-MS (negativ): $m/z = 511.1036$ $[M - H]^-$ ($m/z = 511.1039$ $[M - H]^-$ berechnet für $C_{23}H_{25}Cl_2N_2O_7$).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.10$ (br, 1 H, H-16), 9.11 (br, 1 H, H-5), 7.28 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, H-18), 7.21 (s, 2 H, H-1, H-1'), 6.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, H-12, H-12'), 6.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-13, H-13'), 5.40 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, H-6), 4.65 (dd, $J = 11.2, 4.4$ Hz, 1 H, H-8), 2.95-2.83 (m, 2 H, H-11), 2.66 (s, 3 H, H-17), 1.38 (s, 9 H, H-21).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.7$ (1 C, Cq, C-7), 169.7 (1 C, Cq, C-9), 155.8 (1 C, Cq, C-15), 154.8 (1 C, Cq, C-19), 148.5 (1 C, Cq, C-3), 130.0 (1 C, Cq, C-4), 129.5 (2 C, CH, C-13, C-13'), 128.2 (2 C, CH, C-1, C-1'), 127.7 (1 C, Cq, C-12), 121.8 (2 C, Cq, C-2, C-2'), 115.0 (2 C, CH, C-14, C-14'), 78.4 (1 C, Cq, C-20), 60.8 (1 C, CH, C-8), 53.6 (1 C, CH, C-6), 34.2 (1 C, CH_3 , C-17), 32.8 (1 C, CH_2 , C-11), 28.2 (3 C, C-21).

Die NMR-Spektren weisen Signale von zwei Rotationsisomeren auf. Aufgelistet sind die Signale des Hauptisomers.

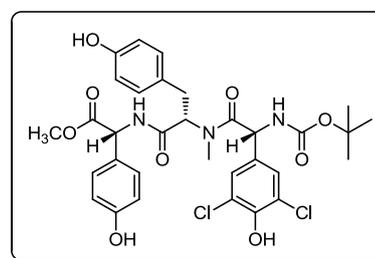
III.14.9. MeO-D-HPG-N-Me-L-Tyr-D-HPG-Cl₂-Boc (123)



213 mg (0.98 mmol, 1.0 eq) des Dipeptids **117** wurden in einem THF-DMF-Gemisch (2:1, 10 mL THF/mmol Dipeptid) gelöst. Unter Eisbadkühlung wurden 497 mg (0.98 mmol, 1.0 eq) D-4-HPG-methylester HCl (**17**), 200 mg (1.47 mmol, 1.5 eq) HOAT, 282 mg (1.47 mmol, 1.5 eq) EDC · HCl und 123 mg (1.47 mmol, 1.5 eq) NaHCO₃ zu der Dipeptid-Lösung gegeben. Anschließend wurde bei RT 21 h gerührt. THF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit EtOAc (66 mL/mmol) verdünnt. Die organische Phase wurde mit dest. Wasser gewaschen, wobei die wässrige Phase in EtOAc reextrahiert wurde. Anschließend wurden die vereinten organischen Phasen drei Mal mit 40 %iger Zitronensäure-Lösung und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nachdem über MgSO₄ getrocknet und filtriert wurde, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Pentan/Aceton, 1:1, R_f = 0.73) gereinigt. Dies lieferte eine Ausbeute von 84 % (558 mg, 0.83 mmol). Das Produkt **123** war ein rotes Öl.

Summenformel: C₃₂H₃₅Cl₂N₃O₉.

Molmasse: 676.54 g/mol.



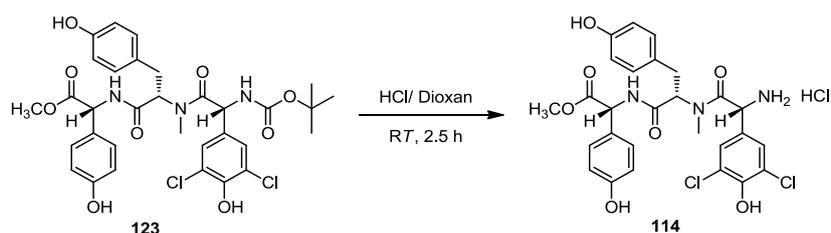
HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 676.1818$ [M + H]⁺ ($m/z = 676.1829$ [M + H]⁺ berechnet für C₃₂H₃₆Cl₂N₃O₉), 698.1642 [M + Na]⁺ ($m/z = 698.1648$ [M + Na]⁺ berechnet für C₃₂H₃₅Cl₂N₃NaO₉), 1353.3552 [2M + H]⁺. ($m/z = 1353.3549$ [2M + H]⁺ berechnet für C₆₄H₇₁Cl₄N₆O₁₈), 1375.3367 [2M + Na]⁺. ($m/z = 1375.3369$ [2M + Na]⁺ berechnet für C₆₄H₇₀Cl₄N₆NaO₁₈).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.11 (br, 1 H, Ar-OH), 9.54 (br, 2 H, Ar-OH), 8.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 1 H, NH), 7.30 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H, NH), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.10 (s, 2 H, Ar-H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, Ar-H), 6.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, Ar-H), 6.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, Ar-H), 5.40 (d, *J* = 7.6 Hz,

1 H, H α), 5.35 (m, 1 H, H α), 5.28 (d, J = 6.9 Hz, 1 H, H α), 3.63 (s, 3 H, OCH₃), 3.00 (m, 1 H, CH₂), 2.89 (s, 3 H, NCH₃), 2.69 (dd, J = 14.7, 10.6.1 Hz, 1 H, CH₂), 1.33 (s, 9 H, *tert*-Bu-H).

Das NMR-Spektrum weist Signale von zwei Rotationsisomeren auf. Aufgelistet sind die Signale des Hauptisomers.

III.14.10. MeO-D-HPG-N-Me-L-Tyr-D-HPG-Cl₂-NH₂ (114)



697 mg (1.03 mmol, 1.0 eq) des Dipeptids **123** wurde mit 5.15 mL (20.6 mmol, 20.0 eq) 4 N HCl in Dioxan bei 0 °C versetzt und 2.5 h bei RT gerührt. Überschüssiges HCl und Dioxan wurden unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde zwei Mal in MeOH und ein Mal in Diethylether aufgenommen und wieder aufkonzentriert. Schließlich wurde im Vakuum getrocknet. Das *N*-entschützte Dipeptid **114** wurde als braunes Öl in quantitativer Ausbeute (613 mg, 1.00 mmol) erhalten.

Summenformel:

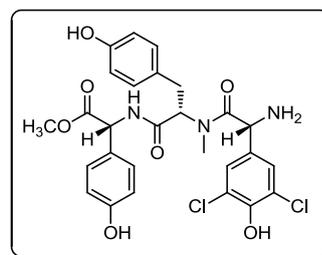
C₂₇H₂₇Cl₂N₃O₇.

Molmasse:

576.43 g/mol.

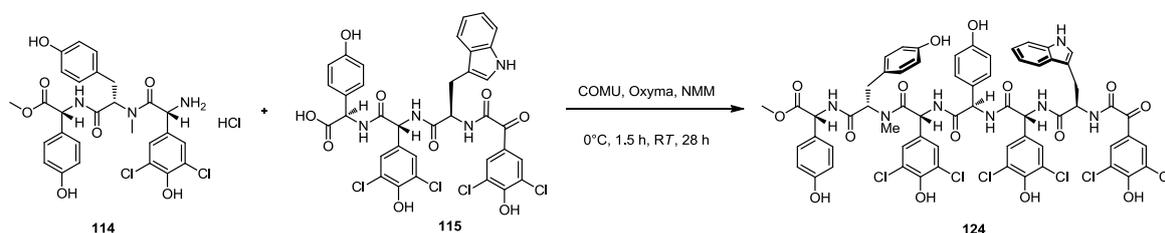
HR-ESI-MS (positiv):

m/z = 576.1293 [M + H]⁺ (m/z = 576.1304 [M + H]⁺ berechnet für C₂₃H₂₇Cl₂N₂O₇), 1153.2509 [2M + H]⁺. (m/z = 1153.2501 [2M + H]⁺ berechnet für C₅₄H₅₅Cl₄N₆O₁₄).



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.92 (d, J = 7.0 Hz, 1 H, NH), 8.42 (br, 4 H, Ar-OH, NH₂), 7.12 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.11 (s, 2 H, Ar-H), 6.87 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, Ar-H), 6.76 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 6.53 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, Ar-H), 5.58 (dd, J = 11.8 Hz, 4.0 Hz, 1 H, H α), 5.41 (m, 1 H, H α), 5.29 (d, J = 7.0 Hz, H α), 3.63 (s, 3 H, OCH₃), 2.96 (dd, J = 14.8, 3.8 Hz, 1 H, CH₂), 2.81 (s, 3 H, NCH₃), 2.73 (dd, J = 14.9, 12.1 Hz, 1 H, CH₂).

III.14.11. C-geschützte lineare Peptidvorstufe **124** von Complestatin (13)

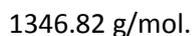


64 mg (0.15 mmol, 1.0 eq) COMU und 21 mg (0.15 mmol, 1.0 eq) Oxyma wurden bei 0 °C zu einer Mischung aus 117 mg (0.15 mmol, 1.0 eq) **115**, 100 mg (0.15 mmol, 1.0 eq) **114** und 33 µL (30 mg, 0.30 mmol, 2.0 eq) NMM gelöst in 0.6 mL DMF (4 mL/mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h bei 0 °C und 28 h bei RT gerührt. Als die HPLC-Reaktionskontrolle nach 19.5 h noch intensive Edukt-Signale zeigte, wurde noch mal Kupplungsreagenzien (Mengen wie oben) und 0.6 mL DMF zur Reaktionsmischung gegeben. Anschließend wurde die Reaktions-Lösung mit EtOAc verdünnt und zwei Mal mit dest. Wasser gewaschen. Die EtOAc-Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck von EtOAc befreit. Der Rückstand wurde über eine semi-präparative HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05 % TFA, 0-2min 95 % A, 2-25 min 5 % A, 25-26 min 5 % A, 26-26.10 min 95 % A, 26.10-36 min 95 % A; Flussrate: 10 mL/min, Säule: Eruospher II 100-5 C18 250x8mm) gereinigt, um das gewünschte Produkt **124** in reiner Form als ein weißes Pulver zu erhalten. Es ergab eine Ausbeute von 16 % (31.3 mg, 0.023 mmol).

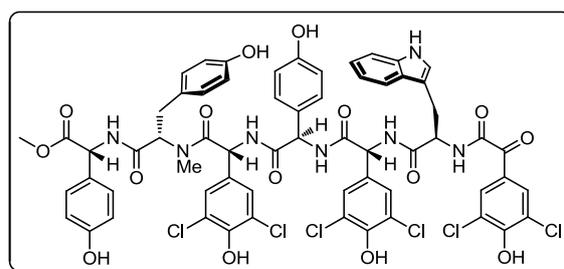
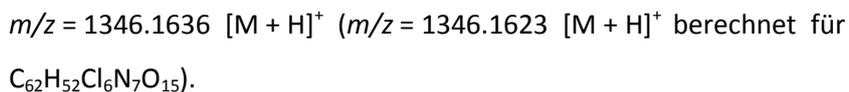
Summenformel:



Molmasse:

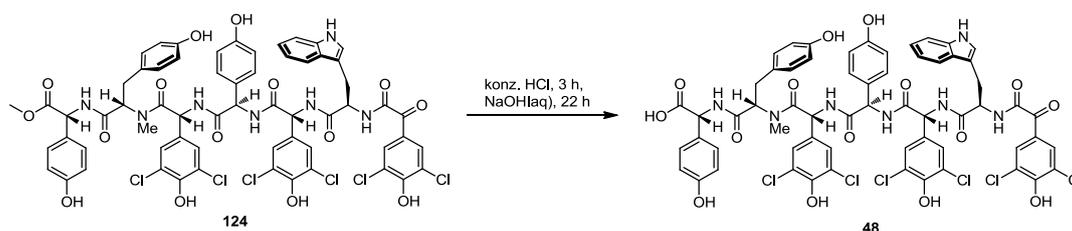


HR-ESI-MS (positiv):

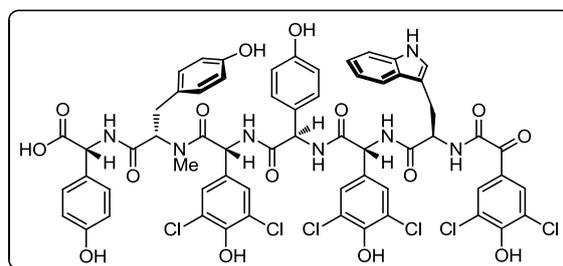


Eine genaue NMR-spektroskopische (¹H-NMR, 400 MHz, DMSO-d₆) Signal-Zuordnung ist aufgrund der komplexen Mischung unterschiedlicher Konformere nicht möglich. Die charakteristischen Signale folgender funktionaler Gruppen sind eindeutig zu erkennen: Indol-NH, Ar-OH, H_α, O-Me, CH₂, N-Me.

III.14.12. Lineare Peptidvorstufe 48 von Complestatin (13)



Das C-geschützte Heptapeptid **124** (17.1 mg, 12.7 μmol , 1.0 eq) wurde in MeOH (HPLC-grade) gelöst und in einem Eiswasserbad auf 0 bis 5 °C gekühlt. Konzentrierte HCl (1.3 μL , 15.2 μmol , 1.2 eq) wurde zugegeben und es wurde bei RT 3 h gerührt. Anschließend wurde mittels Eiswasserbad gekühlt und eine 2.5 M NaOH-Lösung (72 μL , 180 μmol , 14 eq) zugegeben und bei RT für 22 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit konzentrierter HCl auf pH 6 eingestellt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter vermindertem Druck aufkonzentriert und via semi-präparative HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05 % TFA, 0-2min 95 % A, 2-25 min 5 % A, 25-26 min 5 % A, 26-26.10 min 95 % A, 26.10-36 min 95 % A; Flussrate: 10 mL/min, Säule: Eruospher II 100-5 C18 250x8mm) gereinigt, so dass das gewünschte azyklische Produkt **48** als blass gelbes Pulver in einer Ausbeute von 11 % (1.8 mg, 1.35 μmol) erhalten wurde.



Summenformel: $\text{C}_{61}\text{H}_{49}\text{Cl}_6\text{N}_7\text{O}_{15}$.

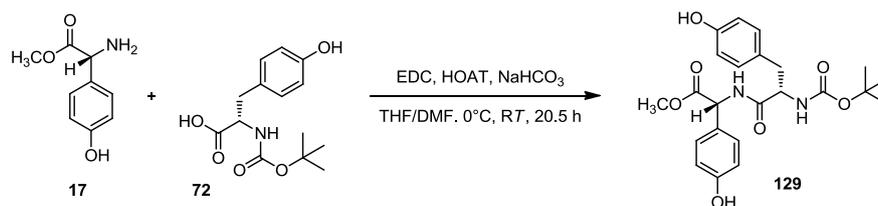
Molmasse: 1332.80 g/mol.

HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 1332.1494$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($m/z = 1332.1467$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{61}\text{H}_{50}\text{Cl}_6\text{N}_7\text{O}_{15}$).

HR-ESI-MS (negativ): $m/z = 1330.1304$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($m/z = 1330.1310$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{61}\text{H}_{48}\text{Cl}_6\text{N}_7\text{O}_{15}$).

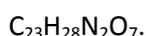
Eine genaue NMR-spektroskopische (^1H -NMR, 500 MHz, DMSO-d_6) Signal-Zuordnung ist aufgrund der komplexen Mischung unterschiedlicher Konformere nicht möglich. Die charakteristischen Signale folgender funktionaler Gruppen sind eindeutig zu erkennen: COOH, Indol-NH, Ar-OH, H_α , CH_2 , N-Me.

III.14.13. Complestatin-Derivat **129**: MeO-D-HPG-L-Tyr-Boc (**129**)



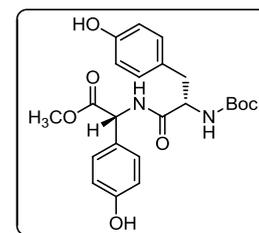
Zu einer Lösung aus 3.45 g (12.26 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-L-Tyr (**72**) in 120 mL THF (10 mL/mmol) und 120 mL DMF (10 mL/mmol) wurde unter Eisbadkühlung 2.67 g (12.26 mmol, 1.0 eq) *D*-4-HPG-OMe (**17**), 2.50 g (18.39 mmol, 1.5 eq) HOAT, 3.53 g (18.39 mmol, 1.5 eq) EDC · HCl und 1.55 g (18.39 mmol, 1.5 eq) NaHCO₃ gegeben und bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde nach 20 h von den flüchtigen Anteilen unter vermindertem Druck befreit. Der Rückstand wurde mit EtOAc verdünnt und jeweils ein Mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum blieb das Produkt **129** als dunkel-gelbes Pulver in einer Ausbeute von 60 % (3.25 g, 7.31 mmol) zurück.

Summenformel:



Molmasse:

444.48 g/mol.



ESI-MS (positiv):

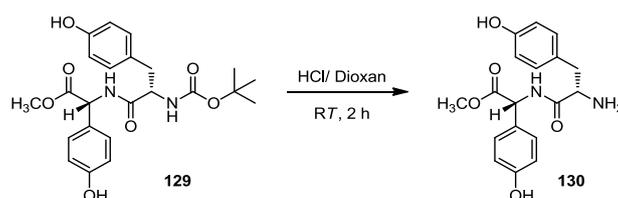
$m/z = 467.2$ [M + Na]⁺, 911.4 [2M + Na]⁺.

HR-ESI-MS (positiv):

$m/z = 467.1792$ [M + Na]⁺ ($m/z = 467.1789$ [M + Na]⁺ berechnet für C₂₃H₂₈NaN₂O₇).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.52 (br, 1 H, OH), 9.14 (br, 1 H, OH), 8.52 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, NH), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, Ar-H), 6.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, NH), 6.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 6.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, Ar-H), 5.26 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H, H_α), 4.20 (td, *J* = 9.4, 4.6 Hz, 1 H, H_α), 3.62 (s, 3 H, OCH₃), 2.77 (dd, *J* = 13.8, 4.3 Hz, 1 H, CH₂), 2.58 (dd, *J* = 13.5, 10.1 Hz, 1 H, CH₂), 1.30 (s, 9 H, H-*tert*-Bu).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 171.7 (1 C, C=O), 171.2 (1 C, C=O), 157.4 (1 C, Cq), 155.7 (1 C, Cq), 155.1 (1 C, C=O), 130.1 (2 C, CH), 128.7 (2 C, CH), 127.9 (1 C, Cq), 126.4 (1 C, Cq), 115.3 (2 C, CH), 114.7 (2 C, CH), 78.0 (1 C, Cq), 55.7 (1 C, C_α), 55.6 (1 C, C_α), 52.1 (1 C, OCH₃), 36.9 (1 C, CH₂), 28.1 (3 C, *tert*-Bu-C).

III.14.14. Complestatin-Derivat 137: MeO-D-HPG-L-Tyr-NH₂ (130)

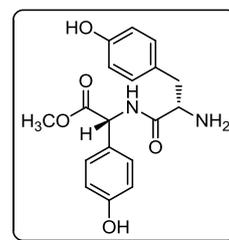
2.32 g (5.21 mmol, 1.0 eq) des Dipeptids **129** wurden mit 26 mL (104.20 mmol, 20.0 eq) 4 N HCl in Dioxan bei 0 °C versetzt und 2 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde unter Eisbadkühlung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gequenchet, bis ein pH-Wert von 8 eingestellt war. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das N-entschützte Produkt **130** als roten Schaum in quantitativer Ausbeute (1.79 g, 5.21 mmol).

Summenformel: C₁₈H₂₀N₂O₅.

Molmasse: 344.36 g/mol.

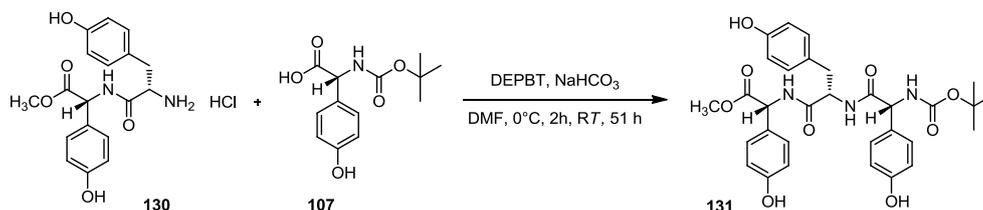
ESI-MS (positiv): $m/z = 345.1 [M + H]^+$, $367.1 [M + Na]^+$.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 7.10 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H, Ar-H), 7.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, Ar-H), 5.38 (s, 1 H, H_α), 4.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 1 H, H_α), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 3.15-3.10 (m, 1 H, CH₂), 3.07-3.03 (m, 1 H, CH₂).



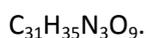
III.14.15. Complestatin-Derivat 137: MeO-D-HPG-L-Tyr-D-HPG-

Boc (131)



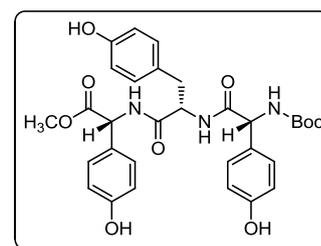
Eine Mischung aus 1.00 g (2.63 mmol, 1.0 eq) Dipeptid **130**, 914 mg (3.42 mmol, 1.3 eq) *N*-Boc-D-4-HPG (**107**), 1.26 g (4.21 mmol, 1.6 eq) DEPBT und 287 mg (2.63 mmol, 1.0 eq) NaHCO₃ in 35 mL DMF (10 ml/mmol) wurde für 2 h bei 0 °C und 51 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Diethylether verdünnt und drei Mal mit einer 1 N HCl-Lösung (aq) gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Ethylacetat re-extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden drei Mal mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und ein Mal mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, um das di-geschützte Tripeptid **131** als gelbes Öl in einer Ausbeute von 64 % (998 mg, 1.68 mmol) zu erhalten.

Summenformel:



Molmasse:

593.62 g/mol.



ESI-MS (positiv):

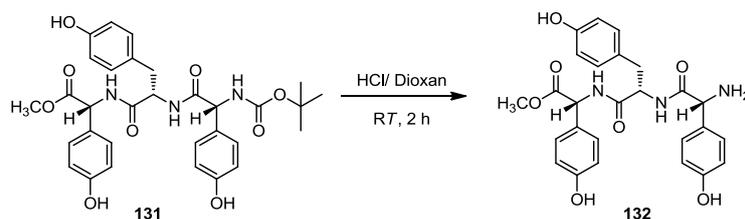
$m/z = 616.2 [M + Na]^+$, $1209.5 [2M + Na]^+$.

¹H NMR (400 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 8.65$ (br, 1 H, Ar-OH), 8.53 (br, 1 H, Ar-OH), 8.25 (br, 1 H, Ar-OH), 7.50 (br, 1 H, NH), 7.18 - 7.14 (m, 4 H, Ar-H), 6.82 - 6.76 (m, 6 H, Ar-H), 6.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.34 (br, 1 H, NH), 5.36 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, H α), 5.19 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, H α), 4.72 (q, $J = 7.2$ Hz, 1 H, H α), 3.65 (s, 3 H, OCH₃), 2.90 - 2.76 (CH₂ unter dem H₂O-Restprotonensignal des Lösungsmittels), 1.36 (s, 9 H, H-*tert*-Bu).

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-d₆): $\delta = 171.9$ (1 C, C=O), 171.3 (1 C, C=O), 171.2 (1 C, C=O), 158.4 (1 C, Cq), 157.9 (1 C, Cq), 156.9 (1 C, Cq), 131.2 (2 C, CH), 129.8 (2 C, CH), 129.5 (2 C, CH), 129.4 (1 C, Cq), 128.4 (1 C, Cq), 128.1 (1 C, Cq), 116.4 (2 C, CH), 116.1 (2 C, CH), 115.9 (2 C, CH), 79.4 (1 C, Cq), 57.0 (1 C, C α), 55.58 (1 C, C α), 55.2 (1 C, C α), 52.5 (1 C, OCH₃), 37.8 (1 C, CH₂), 28.6 (3 C, *tert*-Bu-C).

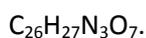
Das Carbonyl-C-Atom der *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe ist nicht detektierbar.

III.14.16. Complestatin-Derivat **137**: MeO-D-HPG-L-Tyr-D-HPG-NH₂ (**132**)



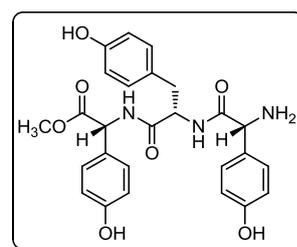
356 mg (0.60 mmol, 1.0 eq) des Tripeptids **131** wurden mit 3 mL (12.00 mmol, 20.0 eq) 4 N HCl in Dioxan bei 0 °C versetzt und 2 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde unter Eisbadkühlung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gequenchet, bis ein pH-Wert von 8 eingestellt war. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das *N*-entschützte Produkt **132** als gelben Schaum in einer Ausbeute von 78 % (231 mg, 0.47 mmol).

Summenformel:



Molmasse:

493.51 g/mol.



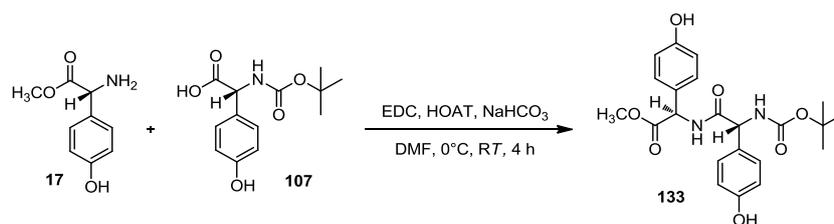
ESI-MS (positiv):

$m/z = 494.2 [M + H]^+$, $987.4 [2M + H]^+$, $516.2 [M + Na]^+$, $1009.4 [2M + Na]^+$.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 9.66$ (br, 1 H, Ar-OH), 9.48 (br, 1 H, Ar-OH), 9.28 (br, 1 H, Ar-OH), 8.79 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H, NH), 8.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, NH), 7.10 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 7.05 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, Ar-H), 5.26 (d, $J = 7.1$ Hz, 1 H, H α), 4.60 (q, $J = 7.5, 6.7$ Hz, 1 H, H α), 4.35 (s, 1 H, H α), 3.62 (s, 3 H, OCH₃), 2.74 (dd, $J = 13.6, 5.0$ Hz, 1 H, CH₂), 2.66 (dd, $J = 13.8, 8.4$ Hz, 1 H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 172.1$ (1 C, C=O), 171.3 (1 C, C=O), 170.8 (1 C, C=O), 157.5 (1 C, Cq), 156.7 (1 C, Cq), 155.9 (1 C, Cq), 131.3 (1 C, Cq), 130.2 (2 C, CH), 128.8 (2 C, CH), 128.1 (2 C, CH), 127.0 (1 C, Cq), 126.2 (1 C, Cq), 115.4 (2 C, CH), 114.8 (4 C, CH), 57.6 (1 C, C α), 55.6 (1 C, C α), 53.5 (1 C, C α), 52.2 (1 C, OCH₃), 29.0 (1 C, CH₂).

III.14.17. Complestatin-Derivat **133**: MeO-D-HPG-D-HPG-Boc (**133**)



Zu einer Lösung aus 3.19 g (11.95 mmol, 1.3 eq) *N*-Boc-D-4-HPG (**107**) in 92 mL DMF (10 mL/mmol) wurde unter Eisbadkühlung 2.00 g (9.20 mmol, 1.0 eq) D-4-HPG-OMe (**17**), 1.88 g (13.80 mmol, 1.5 eq) HOAT, 2.65 g (2.16 mmol, 1.5 eq) EDC · HCl und 773 mg (9.20 mmol, 1.0 eq) NaHCO₃ gegeben und bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde nach 4 h mit EtOAc verdünnt und ein Mal mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EtOAc re-extrahiert und die kombinierten EtOAc-Phasen wurden sieben Mal mit dest. Wasser, ein Mal mit 1 N HCl (aq), drei Mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum entstand ein gelber Schaum. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Aceton 3:1 bis 1:2, R_f(1:1) = 0.46) führte zu 3.83 g (8.89 mmol) an reinem Produkt **133** als weißer Schaum. Dies entspricht einer Ausbeute von 97 %.

Summenformel: C₂₂H₂₆N₂O₇.

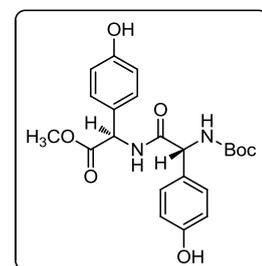
Molmasse: 430.45 g/mol.

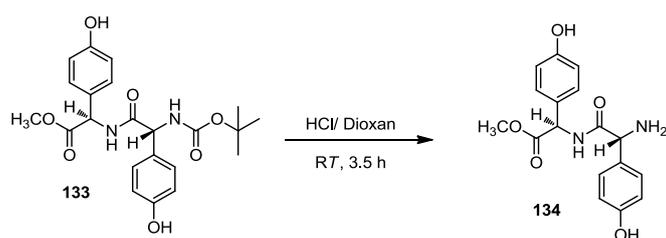
ESI-MS (positiv): $m/z = 453.2[M + Na]^+$, 883.3 [2M + Na]⁺.

HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 453.1632 [M + Na]^+$ ($m/z = 453.1632 [M + Na]^+$ berechnet für C₂₂H₂₆NaN₂O₇).

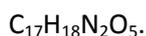
¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 9.55 (br, 1 H, Ar-OH), 9.36 (br, 1 H, Ar-OH), 8.72 (d, *J* = 6.7 Hz, 1 H, NH), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH), 6.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 5.27 (d, *J* = 6.7 Hz, 1 H, H_α), 5.22 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H_α), 3.54 (s, 3 H, OCH₃), 1.37, (s, 9 H, H-*tert*-Bu).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 160.7 (1 C, C=O), 152.6 (2 C, CH), 147.9 (1 C, Cq), 147.1 (1 C, C=O), 145.1 (1 C, C=O), 119.4 (2 C, CH), 119.3 (1 C, Cq), 118.8 (1 C, Cq), 116.5 (1 C, Cq), 105.7 (2 C, CH), 105.2 (2 C, CH), 68.6 (1 C, Cq), 47.0 (1 C, C_α), 46.2 (1 C, C_α), 42.3 (1 C, OCH₃), 26.1 (3 C, *tert*-Bu-C).



III.14.18. Complestatin-Derivat 137: MeO-D-HPG-D-HPG-NH₂ (134)

700 mg (1.63 mmol, 1.0 eq) des Dipeptids **133** wurden mit 8.15 mL (32.6 mmol, 20.0 eq) 4 N HCl in Dioxan bei 0 °C versetzt und 3.5 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde unter Eisbadkühlung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gequencht, bis ein pH-Wert von 8 eingestellt war. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das N-entschützte Produkt **134** als gelbes Öl in einer Ausbeute von 96 % (516 mg, 1.56 mmol).

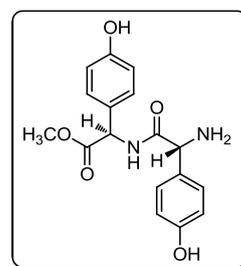
Summenformel:**Molmasse:**

330.34 g/mol.

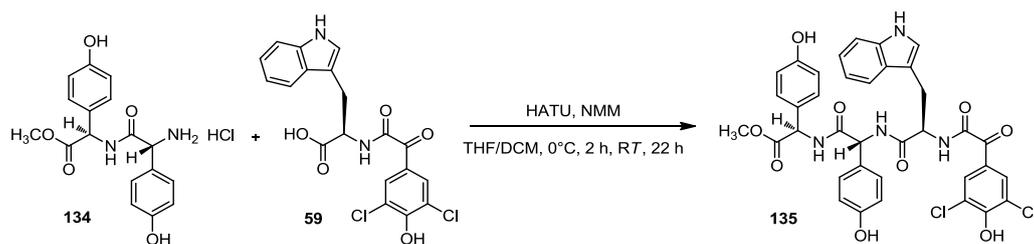
ESI-MS (positiv):
 $m/z = 331.1 [M + H]^+, 353.1[M + Na]^+, 661.3 [2M + H]^+, 683.3 [2M + Na]^+.$
HR-ESI-MS (positiv):
 $m/z = 353.1097 [M + Na]^+ (m/z = 353.1108 [M + Na]^+ \text{ berechnet für } C_{17}H_{18}NaN_2O_5).$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.51-9.30 (br, 2 H, Ar-OH), 8.66 (d, *J* = 6.9 Hz, 1 H, NH), 7.17 (dd, *J* = 8.6, 2.8 Hz, 4 H, Ar-H), 6.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, Ar-H), 5.26 (d, *J* = 4.7 Hz, 1 H, H_α), 4.36 (s, 1 H, H_α), 3.57 (s, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 173.3 (1 C, C=O), 171.2 (1 C, C=O), 157.4 (1 C, C_q), 156.3 (1 C, C_q), 132.6 (1 C, C_q), 128.8 (2 C, CH), 127.8 (2 C, CH), 126.5 (1 C, C_q), 115.4 (2 C, CH), 114.7 (2 C, CH), 57.5 (1 C, C_α), 55.5 (1 C, C_α), 52.1 (1 C, OCH₃).



III.14.19. Complestatin-Derivat 137: Tetrapeptid-OMe (135)

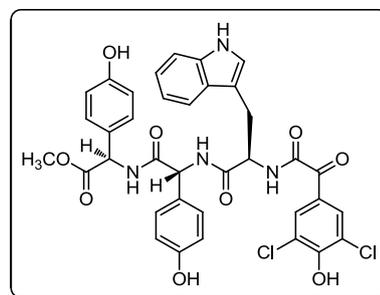


Zu einer Lösung aus 276 mg (0.84 mmol, 1.0 eq) **134** und 389 mg (0.92 mmol, 1.1 eq) **59** in einem Lösungsmittel-Gemisch aus 10 mL THF und 30 mL DCM (1:3, 48 mL/mmol) wurden bei 0 °C 350 mg (0.92 mmol, 1.1 eq) HATU und 0.46 mL (425 mg, 4.20 mmol, 5.0 eq) NMM zugegeben. Nachdem die Reaktionsmischung 2 h bei 0 °C und 22 h bei RT gerührt wurde, wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit dest. Wasser aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit einer wässrigen 1 N HCl-, gesättigten NaHCO₃- und gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Es wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Aceton, 1:1 bis 0:1, R_f(1:1) = 0) lieferte das gewünschte Produkt **135** als roten Feststoff in einer Ausbeute von 67 % (410 mg, 0.56 mmol).

Summenformel: C₃₆H₃₀Cl₂N₄O₉.

Molmasse: 733.55 g/mol.

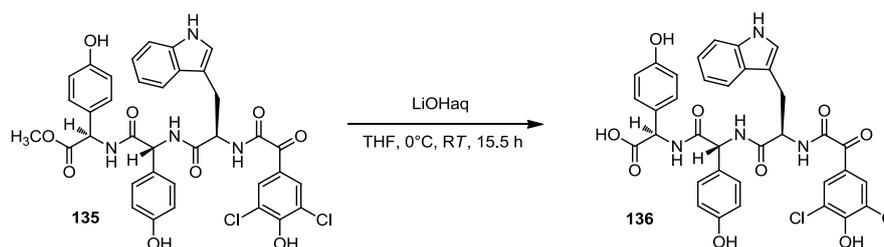
ESI-MS (positiv): $m/z = 755.1 [M + Na]^+$.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.81 (br, 1 H, Indol-NH), 9.57 (br, 1 H, Ar-OH), 9.40 (br, 1 H, Ar-OH), 8.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, NH), 8.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, NH), 8.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, NH), 7.72 (s, 2 H, Ar-H), 7.68 (d, *J* = 6.7 Hz, 1 H, Indol-H), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, Indol-H), 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.15 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Indol-H), 7.03 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.2 Hz, 1 H, Indol-H), 6.91 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.1 Hz, 1 H, Indol-H), 6.76 (dd, *J* = 8.5, 6.5 Hz, 4 H, Ar-H), 5.70-5.55 (m, 1 H, Ha), 5.35-5.21 (m, 1 H, Ha), 4.86 (dt, *J* = 9.8, 4.9 Hz, 1 H, Ha), 3.55 (s, 3 H, OCH₃), 3.22 (dd, *J* = 14.7, 4.2 Hz, 1 H, CH₂), 3.04 (dd, *J* = 14.7, 10.1 Hz, 1 H, CH₂).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 186.1 (1 C, C=O), 171.1 (1 C, C=O), 170.2 (1 C, C=O), 170.0 (1 C, C=O), 163.8 (1 C, C=O), 157.6 (1 C, Cq), 156.8 (1 C, Cq), 154.6 (1 C, Cq), 136.0 (1 C, Cq), 130.4 (2 C, CH), 129.2 (2 C, CH), 128.6 (2 C, CH), 128.4 (1 C, Cq), 127.2 (1 C, Cq), 125.9 (1 C, Cq), 125.4 (1 C, Cq), 123.8 (1 C, Cq), 122.2 (2 C, Cq), 120.8 (1 C, CH), 118.7 (1 C, CH), 118.2 (1 C, CH), 115.4 (2 C, CH), 114.9 (2 C, CH), 111.4 (1 C, CH), 109.6 (1 C, Cq), 56.0 (1 C, CH), 55.1 (1 C, CH), 53.2 (1 C, CH), 52.0 (1 C, OCH₃), 27.8 (1 C, CH₂).

III.14.20. Complestatin-Derivat 137: Tetrapeptid-OH (136)

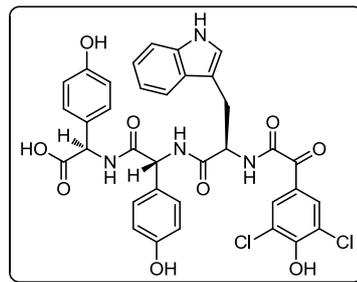


In einem 100 mL-Rundkolben wurden 690 mg (0.94 mmol, 1.0 eq) des Tetrapeptid-Methylesters **135** in einem Minimum an THF (7 mL) gelöst. 28 mL (2.82 mmol, 3.0 eq) einer 0.1 N LiOH-Lösung (aq) wurden bei 0 °C über einen Zeitraum von 40 min tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und 15.5 h gerührt. Nachdem THF unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde die basische wässrige Phase zwei Mal mit Ethylacetat gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mittels 10 %iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von 1 bis 2 eingestellt und zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Extraktion wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das C-entschützte Tetrapeptid **136** als einen roten Schaum in einer Ausbeute von 87 % (587 mg, 0.82 mmol).

Summenformel: $C_{35}H_{28}Cl_2N_4O_9$.

Molmasse: 719.52 g/mol.

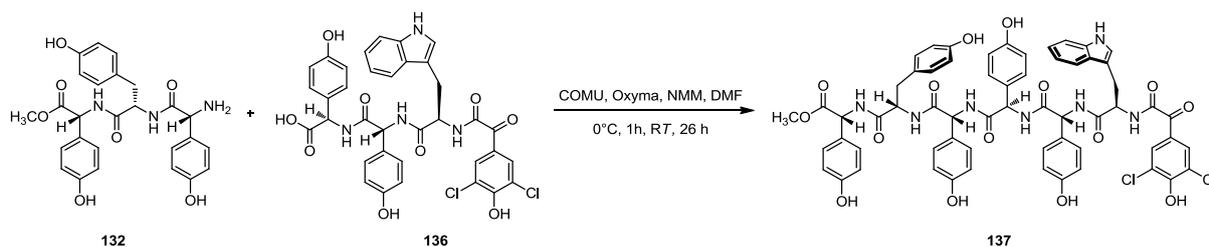
ESI-MS (negativ): $m/z = 717.2 [M - H]^-$.



1H -NMR (400 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 9.98$ (br, 1 H, Indol-NH), 8.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, NH), 8.11 (s, 2 H, Ar-H), 7.97 (dd, $J = 13.3, 7.3$ Hz, 2 H, NH), 7.66 (dq, $J = 8.1, 0.9$ Hz, 1 H, Indol-H), 7.35 (dt, $J = 8.0, 0.9$ Hz, 1 H, Indol-H), 7.30 (d, $J = 8.1$ Hz, 4 H, Ar-H), 7.23 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, Indol-H), 7.04 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.1$ Hz, 1 H, Indol-H), 6.92 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.0$ Hz, 1 H, Indol-H), 6.83 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, Ar-H), 6.76 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H, Ar-H), 5.67-5.62 (m, 1 H, H_{α}), 5.48-5.44 (m, 1 H, H_{α}), 4.97 (ddd, $J = 8.0, 6.5, 4.1$ Hz, 1 H, H_{α}), 3.43 (dd, $J = 14.7, 5.3$ Hz, 1 H, CH_2), 3.31 (dd, $J = 14.7, 7.6$ Hz, 1 H, CH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 185.1$ (1 C, C=O), 172.1 (1 C, C=O), 170.7 (1 C, C=O), 170.5 (1 C, C=O), 162.8 (1 C, C=O), 158.3 (1 C, Cq), 157.9 (1 C, Cq), 155.0 (1 C, Cq), 137.5 (2 C, CH), 132.1 (2 C, CH), 130.0 (1 C, Cq), 129.9 (2 C, CH), 129.5 (1 C, Cq), 128.7 (1 C, Cq), 128.6 (1 C, Cq), 127.3 (1 C, Cq), 124.9 (1 C, CH), 122.6 (2 C, Cq), 122.1 (1 C, CH), 119.6 (1 C, CH), 119.4 (1 C, CH), 116.3 (2 C, CH), 116.0 (2 C, CH), 112.2 (1 C, CH), 110.8 (1 C, Cq), 57.0 (1 C, CH), 56.9 (1 C, CH), 54.6 (1 C, CH), 28.9 (1 C, CH_2).

III.14.21. Complestatin-Derivat 137



21 mg (48.6 μmol , 1.0 eq) COMU und 7 mg (48.6 μmol , 1.0 eq) Oxyma wurden zu einer rührenden Mischung aus 35 mg (48.6 μmol , 1.0 eq) Tetrapeptid **136**, 24 mg (48.6 μmol , 1.0 eq) Tripeptid **132**, 11 μL (9.8 mg, 97.3 μmol , 2 eq) NMM in 1 mL DMF bei 0 °C zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch 1 h bei 0 °C und 26 h bei RT gerührt hatte, wurde eine Produkt-Isolierung mittels semi-präparativer HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05 % TFA, 0-2min 95 % A, 2-25 min 5 % A, 25-27 min 5 % A, 27-27.10 min 95 % A, 27.10-35 min 95 % A; Flussrate: 10 mL/min, Säule: Eruospher II 100-5 C18 250x8mm) durchgeführt. Nach Entfernung von ACN unter vermindertem Druck und des Wassers mittels Gefriertrocknung, wurde der Methylester **137** als weißes Pulver in einer Ausbeute von 9 % (5.4 mg, 4.5 μmol) erhalten.

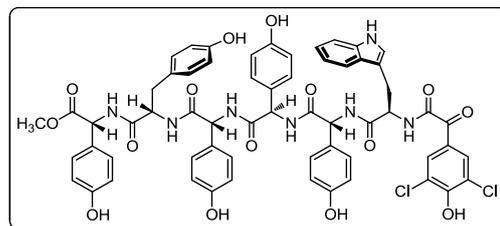
Summenformel: $\text{C}_{61}\text{H}_{53}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_{15}$.

Molmasse: 1195.02 g/mol.

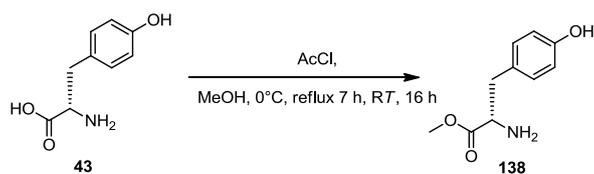
ESI-MS (positiv): $m/z = 1194.3 [\text{M} + \text{H}]^+$, $1216.3 [\text{M} + \text{Na}]^+$.

ESI-MS (negativ): $m/z = 1192.3 [\text{M} - \text{H}]^-$, $596.7 [\text{M} - 2 \text{H}]^{2-}$.

Eine genaue NMR-spektroskopische (^1H -NMR, 500 MHz, DMSO-d_6) Signal-Zuordnung ist aufgrund der komplexen Mischung unterschiedlicher Konformere nicht möglich. Die charakteristischen Signale folgender funktionaler Gruppen sind eindeutig zu erkennen: Ar-OH, $\text{H}\alpha$, NH.



III.14.22. Complestatin-Derivat 128: L-Tyrosinmethylester (138)

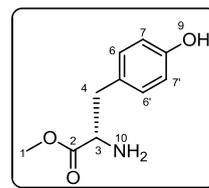


Unter Argon-Atmosphäre wurden 13 mL (1.4 mL/mmol) trockenes Methanol auf 0 °C gekühlt. 5.12 mL (5.63 g, 71.76 mmol, 8.00 eq) frisch dest. Acetylchlorid wurden tropfenweise zugegeben und 5 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 2.78 g (8.97 mmol, 1.00 eq) L-Tyr (**43**) zugegeben und 7 h unter Rückfluss erhitzt, sowie 16 h bei RT gerührt. Nachdem das Methanol im Vakuum entfernt wurde, wurde der Rückstand in dest. Wasser gelöst. Nach Zugabe von 75 mL einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (aq, 8 mL/mmol) wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte L-Tyrosinmethylester (**138**) als blass gelbes Pulver in quantitativer Ausbeute (1.88 g, 8.97 mmol).

Summenformel: C₁₀H₁₃NO₃.

Molmasse: 195.22 g/mol.

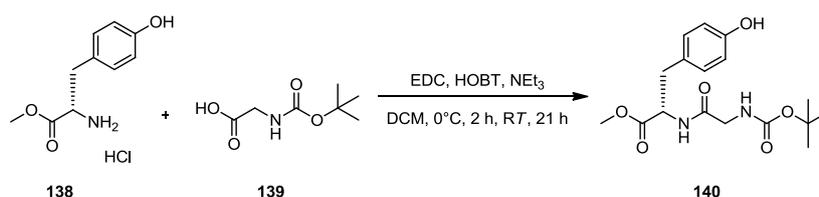
ESI-MS (positiv): $m/z = 196.1$ [M + H]⁺.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.20 (br, 1 H, H-9), 6.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-6, H-6'), 6.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-7, H-7'), 3.57 (s, 3 H, H-1), 3.48 (dd, $J = 6.9, 6.3$ Hz, 1 H, H-3), 2.74 (dd, $J = 13.4, 6.3$ Hz, 1 H, H-4), 2.66 (dd, $J = 13.4, 6.9$ Hz, 1 H, H-4), 1.68 (br, 2 H, H-10).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 175.5 (1 C, C-2), 155.8 (1 C, C-8), 130.1 (2 C, C-6, C-6'), 127.8 (1 C, C-5), 154.0 (2 C, C-7, C-7'), 55.9 (1 C, C-3), 51.3 (1 C, C-1), 40.0 (1 C, C-4).

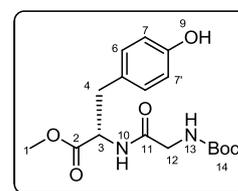
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen des L-Tyrosinmethylester Hydrochlorid-Salzes aus der Literatur überein.¹³⁴

III.14.23. Complestatin-Derivat 128: MeO-L-Tyr-Gly-Boc 140

592 mg, (3.38 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc-Gly (**139**) wurden in 17 mL DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. 862 mg (3.72 mmol, 1.10 eq) L-Tyr-OMe · HCl (**138**), 842 mg (4.39 mmol, 1.30 eq) EDC · HCl, 724 mg 5.36 mmol, 1.60 eq) HOBT und 3.30 mL (2.40 g, 23.7 mmol, 7.00 eq) Triethylamin wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0 °C und 21 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die organische Phase mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit DCM reextrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, 40 % iger Zitronensäure sowie gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/Aceton/MeOH 4:1:1, R_f = 0.91) gereinigt. Dies lieferte 603 mg (1.71 mmol) des Produkts **140**, was einer Ausbeute von 51 % entsprach.

Summenformel:C₁₇H₂₄N₂O₆.**Molmasse:**

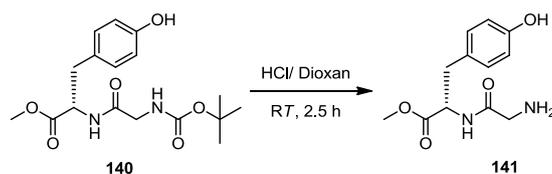
352.38 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 375.2 [M + Na]^+$.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.23 (s, 1 H, H-9), 8.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-10), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-6, H-6'), 6.91 (t, *J* = 6.0 Hz, 1 H, H-13), 6.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-7, H-7'), 4.39 (q, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H-3), 3.58 (s, 3 H, H-1), 3.52 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H, H-12), 2.83 (qd, *J* = 13.8, *J* = 7.0 Hz, 2 H, H-4), 1.37 (s, 9 H, H-14).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹³⁵

III.14.24. Complestatin-Derivat 128: MeO-L-Tyr-Gly-NH₂ 141

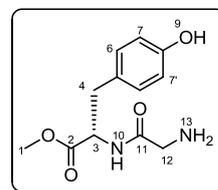


595 mg (1.69 mmol, 1.00 eq) des beidseitig geschützten Dipeptids **140** wurden mit 10.7 mL (42.8 mmol, 25.3) 4 N HCl in Dioxan bei 0 °C versetzt und 2.5 h bei RT gerührt. Das Produkt **141** wurde mit Diethylether gefällt. Der farblose Feststoff wurde filtriert, mit Diethylether gewaschen und in Methanol aufgenommen. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum wurde das Hydrochlorid-Salz des Dipeptids **141** als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute (486 mg, mmol) erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₆N₂O₄.

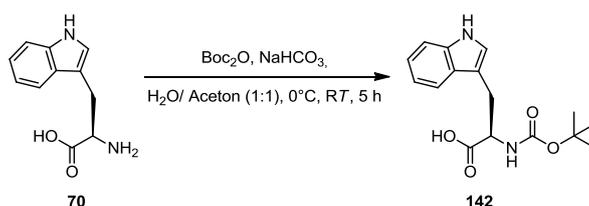
Molmasse: 252.27 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 253.1 [M + H]^+$.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.31 (s, 1 H, H-9), 8.84 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H, H-10), 8.04 (s, 2 H, H-13), 7.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-6, H-6'), 6.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-7, H-7'), 4.48 (td, $J = 8.2, 5.6$ Hz, 1 H, H-3), 3.61 (s, 3 H, H-1), 3.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H, H-12), 2.98 – 2.73 (m, 2 H, H-4).

III.14.25. Complestatin-Derivat 128: N-Boc-D-Trp 142



1.00 g (4.90 mmol, 1.0 eq) D-Tryptophan (**70**) wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton und dest. H₂O in einem Verhältnis von 1:1 (insgesamt 20 mL) gelöst und 9.79 ml (9.79 mmol, 2.0 eq) einer 1 M NaOH-Lösung (aq) zugefügt. Bei 0 °C wurden 1.50 g (9.79 mmol, 2.00 eq) Di-*tert*-butyldicarbonat gelöst in 6 mL Aceton unter Rühren tropfenweise zugegeben, woraufhin die Reaktionslösung 5 h bei RT gerührt wurde. Anschließend wurde das Aceton unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Lösung ein Mal mit DCM gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl (aq) auf pH 2 bis 3 angesäuert und drei Mal mit DCM extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden zwei Mal 40 % iger Zitronensäure (aq) und ein Mal mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen,

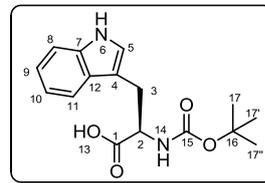
über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde das *N*-Boc-geschützte Produkt **142** als weißes Pulver in einer Ausbeute von 99 % (1.48 g, 4.87 mmol) erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$.

Molmasse: 304.34 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 327.2 [\text{M} + \text{Na}]^+$.

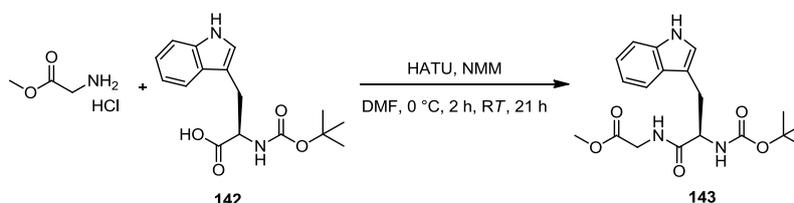
ESI-MS (negativ): $m/z = 303.0 [\text{M} - \text{H}]^-$.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 12.55$ (s, 1 H, H-13), 10.83 (s, 1H, H-6), 7.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, H-11), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, H-8), 7.14 (s, 1 H, H-5), 7.06 (t, $J = 8.1$ Hz, 7.0 Hz, 1 H, H-9), 6.98 (t, $J = 7.9$ Hz, 7.0 Hz, 1 H, H-10), 6.97 (s, 1 H, H-14), 4.13 (m, 1 H, H-2), 3.12 (dd, $J = 14.5$ Hz, 4.7 Hz, 1 H, H-3), 2.96 (dd, $J = 14.5$ Hz, 9.3 Hz, 1 H, H-7), 1.32 (s, 9 H, H-17, H-17', H-17'').

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen des Enantiomers aus der Literatur überein.¹³⁶

III.14.26. Complestatin-Derivat 128: MeO-Gly-D-Trp-Boc 143

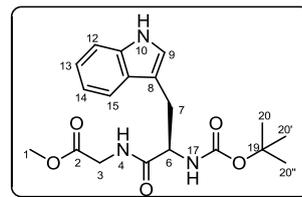


Glycinmethylester Hydrochlorid (615 mg, 4.90 mmol, 1.00 eq.) wurde in 40 mL DMF gelöst und *N*-Boc-D-Trp (**142**, 1.74 g, 5.73 mmol, 1.17 eq.) wurde zugegeben. Bei 0 °C wurden HATU (1.99 g, 5.24 mmol, 1.07 eq.) und NMM (2.69 mL, 24.5 mmol, 5.00 eq.) unter Rühren zugefügt. Nachdem die Reaktionsmischung für 2 h bei 0 °C und 21 h bei RT gerührt wurde, wurde mit 150 mL EtOAc verdünnt und mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EtOAc re-extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung, 40 % iger Zitronensäure sowie gesättigter NaCl -Lösung (aq) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Pentan/Ethylacetat/Methanol 5:1:1, $R_f = 0.93$) gereinigt, um das Produkts **143** als gelben Feststoff in 90 % iger Ausbeute (1.66 g, 4.42 mmol) zu erhalten.

Summenformel: $C_{19}H_{25}N_3O_5$

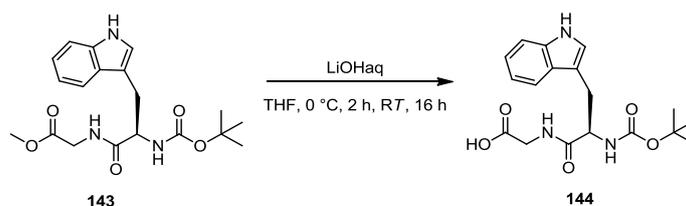
Molmasse: 375.42 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 398.2 [M + Na]^+$.



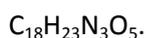
1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.80$ (s, 1 H, H-10), 8.36 (t, $J = 5.9$ Hz, 1 H, H-4), 7.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-15), 7.32 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, H-12), 7.14 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, H-9), 7.06 (ddd, $J = 8.1, 7.0, 1.3$ Hz, 1 H, H-13), 6.98 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.1$ Hz, 1 H, H-14), 6.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, H-17), 4.24 (td, $J = 8.9, 4.4$ Hz, 1 H, H-9), 4.00 – 3.76 (m, 2 H, H-10), 3.64 (s, 3 H, H-1), 3.16-2.90 (m, 2 H, H-7), 1.30 (s, 9 H, H-20, H-20', H-20'').

III.14.27. Complestatin-Derivat 128: HO-Gly-D-Trp-Boc 144

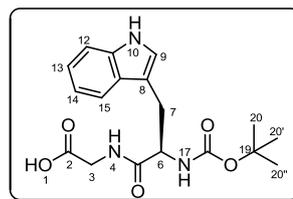
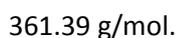


In einem 500 mL-Rundkolben wurden 1.66 g (4.43 mmol, 1.00 eq) des Dipeptid-Methylesters **143** in 20 mL THF gelöst. 159 mL (15.90 mmol, 3.60 eq) einer 0.1 N LiOH-Lösung (aq) wurden bei 0 °C über einen Zeitraum von 2 h tropfenweise dazugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und 16 h gerührt. Nachdem THF unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde die basische wässrige Phase ein Mal mit Ethylacetat gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mittels 1 M HCl-Lösung (aq) auf einen pH-Wert von 1 bis 2 eingestellt und drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Extraktion wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das C-entschützte Dipeptid **144** in quantitativer Ausbeute (1.60 g, 4.43 mmol).

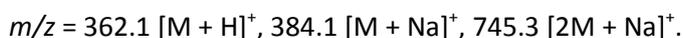
Summenformel:



Molmasse:

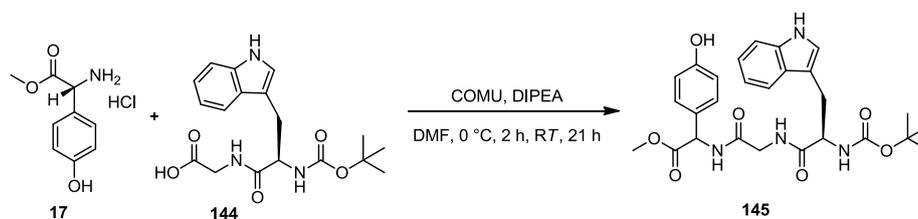


ESI-MS (positiv):



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12.35$ (s, 1 H, H-1), 10.79 (s, 1 H, H-10), 8.22 (t, $J = 5.8$ Hz, 1 H, H-4), 7.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-15), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, H-12), 7.14 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, H-9), 7.09 - 7.02 (m, 1 H, H-13), 6.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H, H-14), 6.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, H-17), 4.22 (td, $J = 9.0, 4.7$ Hz, 1 H, H-6), 3.88 - 3.68 (m, 2 H, H-3), 3.17 - 2.83 (m, 2 H, H-7), 1.30 (s, 9 H, H-20, H-20', H-20'').

III.14.28. Complestatin-Derivat 128: MeO-D-HPG-Gly-D-Trp-Boc 145

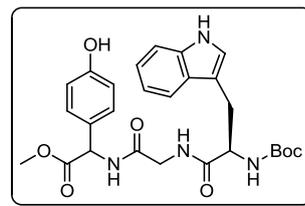


2.25 g (5.25 mmol, 1.24 eq) COMU und 2.74 mL (2.03 g, 15.70 mmol, 3.70 eq) DIPEA wurden bei 0 °C zu einer Mischung aus 1.53 g (4.24 mmol, 1.00 eq) Dipeptid-OH **144** und 0.95 g (4.38 mmol, 1.03 eq) D-4-HPG-OMe · HCl (**17**) gelöst in 53 mL DMF gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 0 °C und 21 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktions-Lösung mit ca. 50 mL EtOAc verdünnt und mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EtOAc reextrahiert und die kombinierten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung, 40 % iger Zitronensäure sowie gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Unter vermindertem Druck wurde EtOAc entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/Aceton/Methanol 4:1:1, $R_f = 0.95$) gereinigt. Das gewünschte Produkt **145** wurde in reiner Form als orangenes Öl in einer Ausbeute von 53 % (1.17 g, 2.23 mmol) erhalten.

Summenformel: $C_{27}H_{32}N_4O_7$.

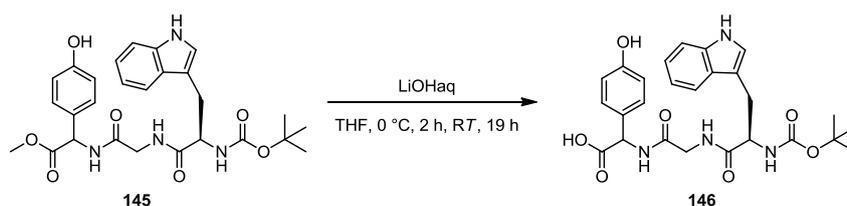
Molmasse: 524.57 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 547.2 [M + Na]^+$.



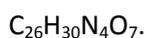
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.79$ (s, 1 H, HN-Indol), 9.55 (s, 1 H, HO-Ar), 8.52 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, NH), 8.18 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H, NH), 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-Indol), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, H-Indol), 7.18 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-Ar), 7.15 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, H-Indol), 7.09 - 7.01 (m, 1 H, H-Indol), 7.01 - 6.91 (m, 1 H, H-Indol), 6.79 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, NH), 6.75 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-Ar), 5.28 (d, $J = 6.7$ Hz, 1 H, $H\alpha$), 4.23 - 4.15 (m, 1 H, $H\alpha$), 3.90 - 3.71 (m, 2 H, CH_2), 3.61 (s, 3 H, O- CH_3), 3.10 (dd, $J = 14.4, 4.4$ Hz, 2 H, CH_2), 1.27 (s, 9 H, H-tert-Bu).

III.14.29. Complestatin-Derivat 128: HO-D-HPG-Gly-D-Trp-Boc 146



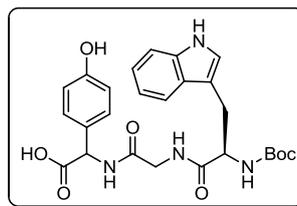
1.16 g (2.21 mmol, 1.00 eq) des Tripeptid-Methylesters **145** wurden in 38 mL THF gelöst. 79.4 mL (7.94 mmol, 3.60 eq) einer 0.1 N LiOH-Lösung (aq) wurden bei 0 °C über einen Zeitraum von 2 h tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und 19 h gerührt. Nachdem THF unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde die basische wässrige Phase zwei Mal mit Ethylacetat gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit einer 10 % iger $KHSO_4$ -Lösung (aq) auf einen pH-Wert von 1 bis 2 eingestellt und vier Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen der sauren Extraktion wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte das C-entschützte Tripeptid **146** als orangenen Feststoff in einer Ausbeute von 97 % (1.10 g, 2.15 mmol).

Summenformel:



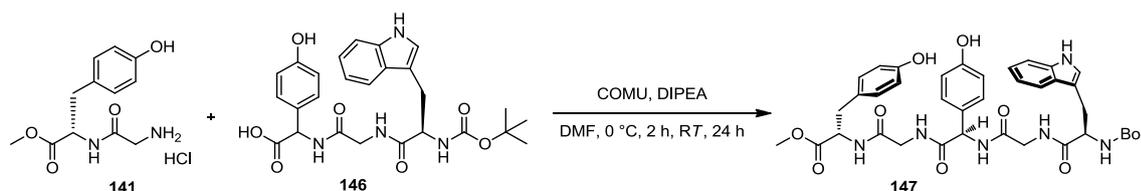
Molmasse:

510.54 g/mol.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.59 (s, 1 H, COOH), 10.79 (s, 1 H, HN-Indol), 9.49 (s, 1 H, HO-Ar), 8.40 (d, J = 7.2 Hz, 1 H, NH), 8.17 (t, J = 5.7 Hz, 1 H, NH), 7.59 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, H-Indol), 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, H-Indol), 7.19 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-Ar), 7.15 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, H-Indol), 7.05 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, H-Indol), 6.96 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, H-Indol), 6.79 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, NH), 6.74 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-Ar), 5.21 (d, J = 7.2 Hz, 1 H, H α), 4.19 (s, 1 H, H α), 3.89 - 3.69 (m, 2 H, CH $_2$), 3.17 - 2.81 (m, 2 H, CH $_2$), 1.27 (s, 9 H, H-*tert*-Bu).

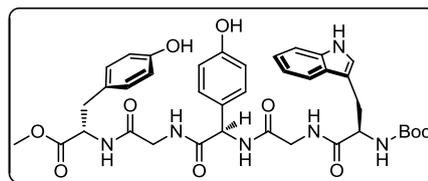
III.14.30. Complestatin-Derivat 128 als Methylester 147



1.12 g (2.60 mmol, 1.54 eq) COMU und 1.10 mL (810 mg, 6.27 mmol, 3.72 eq) DIPEA wurden bei 0 °C zu einer Mischung aus 486 mg (1.68 mmol, 1.00 eq) Dipeptid-NH $_2$ · HCl **141** und 1.10 g (2.15 mmol, 1.28 eq) Tripeptid-OH **146** gelöst in 21 mL DMF gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 0 °C und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktions-Lösung mit ca. 50 mL EtOAc verdünnt und mit dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EtOAc re-extrahiert und die kombinierten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO $_3$ -Lösung, 40 % iger Zitronensäure sowie gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO $_4$ getrocknet und filtriert. Unter vermindertem Druck wurde EtOAc entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/Aceton/Methanol 5:1:1, R_f = 0.74) gereinigt. Nach einer zweiten Aufreinigung mittels MPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-1 min 95% A, 1-13.9 min 95% B; Säule: Reveleris C18 12 g; Flussrate: 30 mL/min) wurde das gewünschte Produkt **147** als gelb-braunen Feststoff in einer Ausbeute von 26 % (325 mg, 0.44 mmol) erhalten.

Summenformel: $C_{38}H_{44}N_6O_{10}$

Molmasse: 744.79 g/mol.



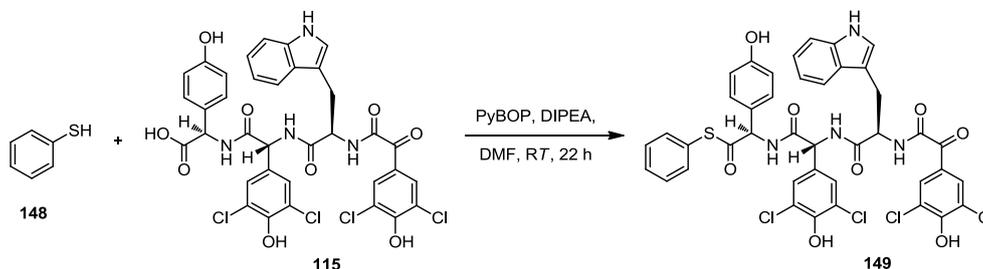
ESI-MS (positiv): $m/z = 767.5 [M + Na]^+$

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta =$ 10.78 (s, 1 H, HN-Indol), 9.38 (s, 1 H, HO-Ar), 9.22 (s, 1 H, HO-Ar), 8.44 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H, NH), 8.35 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H, NH), 8.21 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H, NH), 8.14 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H, NH), 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-Indol), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, H-Indol), 7.22 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-Ar), 7.14 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, H-Indol), 7.05 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, H-Indol), 6.96 (dd, $J = 7.9$, 5.9 Hz, 3 H, H-Indol, H-Ar), 6.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH), 6.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-Ar), 6.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-Ar), 5.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H, H α), 4.38 (td, $J = 8.1$, 6.0 Hz, 1 H, H α), 4.20 (s, 1 H, H α), 3.83 (td, $J = 10.5$, 10.0, 5.9 Hz, 2 H, CH $_2$), 3.76-3.62 (m, 2 H, CH $_2$), 3.56 (s, 3 H, OCH $_3$), 3.01 (ddd, $J = 14.4$, 5.2 Hz, 2 H, CH $_2$), 2.87 – 2.69 (m, 2 H, CH $_2$), 1.28 (s, 9 H, H-*tert*-Bu).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta =$ 172.3 (1 C, C=O), 171.9 (1 C, C=O), 170.3 (1 C, C=O), 168.5 (1 C, C=O), 168.3 (1 C, C=O), 156.9 (1 C, Cq-Ar), 156.0 (1 C, Cq-Ar), 155.2 (1 C, C=O), 136.0 (1 C, Cq-Indol), 130.0 (2 C, HC-Ar), 128.6 (1 C, Cq-Ar), 128.5 (2 C, HC-Ar), 127.3 (1 C, Cq-Indol), 126.9 (1 C, Cq-Ar), 123.6 (1 C, HC-Indol), 120.8 (1 C, HC-Indol), 118.4 (1 C, HC-Indol), 118.1 (1 C, HC-Indol), 115.1 (2 C, HC-Ar), 114.9 (2 C, HC-Ar), 111.2 (1 C, HC-Indol), 110.3 (1 C, HC-Indol), 78.0 (1 C, Cq-*tert*-Bu), 55.7 (1 C, HC α), 55.1 (1 C, HC α), 54.0 (1 C, HC α), 51.8 (1 C, OCH $_3$), 42.2 (1 C, CH $_2$), 41.6 (1 C, CH $_2$), 36.2 (1 C, CH $_2$), 28.1 (3 C, CH $_3$), 27.8 (1 C, CH $_2$).

III.15. Aktivierung durch Thioesterbildung

III.15.1. Aktivierung des Tetrapeptids **115** als Phenylthioester **149**



Unter Argon-Atmosphäre wurde das Tetrapeptid **115** (100 mg, 0.13 mmol, 1.00 eq) in 1 mL trockenem DMF gelöst und mit PyBOP (79 mg, 0.15 mmol, 1.2 eq), DIPEA (26 μ L, 19 mg, 0.15 mmol, 1.2 eq) sowie Thiophenol (**148**, 32 μ L, 34 mg, 0.31 mmol, 2.4 eq) bei RT für 22 h gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit 140 μ L Wasser sowie 280 μ L ACN (HPLC-grade) verdünnt und via semi-präparative HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05 % TFA, 0-2min 95 % A, 2-25 min 5 % A, 25-26 min 5 % A, 26-26.10 min 95 % A, 26.10-36 min 95 % A; Flussrate: 10 mL/min, Säule: Eruospher II 100-5 C18 250x8mm) gereinigt. Nach Evaporation von ACN unter vermindertem Druck mit einer Wasserbad-Temperatur von 31 °C und Entfernung des Wassers durch Gefriertrocknung wurde der aktivierte Thioester **149** als gelbes Pulver in einer Ausbeute von 67 % (77 mg, 0.09 mmol) erhalten.

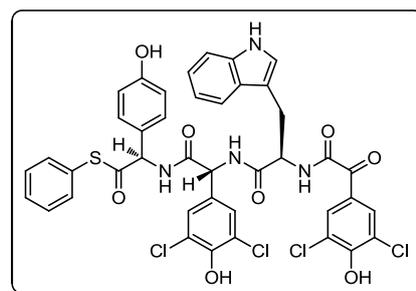
Summenformel: $C_{41}H_{30}Cl_4N_4O_8S$.

Molmasse: 880.58 g/mol.

ESI-MS (positiv): $m/z = 900.9 [M + Na]^+$.

ESI-MS (negativ): $m/z = 877.8 [M - H]^-$.

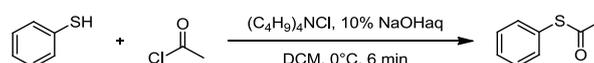
HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 881.0578 [M + H]^+$ ($m/z = 881.0587 [M + H]^+$ berechnet für $C_{41}H_{31}Cl_4N_4O_8S$).



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.84 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H, Indol-NH), 10.18 (br, 1 H, Ar-OH), 9.68 (br, 1 H, Ar-OH), 9.30 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H, NH), 9.02 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, NH), 8.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, NH), 7.76 (s, 2 H, Ar-H), 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, Trp-H), 7.58 (s, 2 H, Ar-H), 7.42, (m, 5 H, S-Ar-H), 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Trp-H), 7.16 (m, 1 H, Indol-N-CH), 7.03 (t, *J* = 7.1 Hz, 1 H, Trp-H), 6.92 (t, *J* = 7.1 Hz, 1 H, Trp-H), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, Ar-H), 5.69 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, Ha), 5.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, H_α), 4.89 (m, 1 H, H_α), 3.23 (m, 1 H, CH₂), 3.06 (m, 1 H, CH₂).

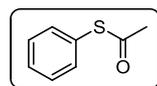
Das NMR-Spektrum weist Signale von Konformeren auf. Aufgelistet sind die Signale des Hauptkonformers.

III.15.2. *S*-Phenylthioacetat



Thiophenol (1.65 g, 1.53 mL, 15 mmol, 1.0 eq) wurde in 20 mL (1.3 mL/mmol) einer 10 % igen NaOH-Lösung (aq) gelöst. Tetra-*n*-butylammoniumchlorid (417 mg, 1.5 mmol, 0.1 eq) wurde in 5 mL (3.3 mL/mmol) DCM sowie Acetylchlorid (1.18 g, 1.07 mL, 15 mmol, 1.0 eq) in 15 mL (1 mL/mmol) DCM gelöst. Nachdem die drei Lösungen auf 0 °C gekühlt wurden, wurden sie gemischt und die Reaktionsmischung wurde 5 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Eiswasser gegeben. Die wässrige Phase wurde zwei Mal in Diethylether extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, wurde das Rohprodukt mittels MPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-2 min 95% A, 2-5.5 min 53% A, 5.5-13 min 53 % A, 13-15 min 32 % A, 15-20.5 min 32 % A, 20.5-28 min 5 % A; Säule: Reveleris[®] C18 40g; Flussrate: 40 mL/min) gereinigt. Die Produkt-enhaltende Fraktion wurde unter vermindertem Druck von ACN befreit und die wässrige Phase drei Mal in Ethylacetat extrahiert. Das Entfernen des Lösungsmittels lieferte 750 mg (4.93 mmol) an *S*-Phenylthioacetat. Da 636 mg (5.78 mmol) des eingesetzten Thiophenols zurückgewonnen wurde, entspricht dies einer Ausbeute von 54 %.

Summenformel: C₈H₈OS.



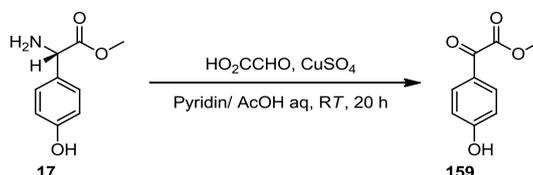
Molmasse: 152.21 g/mol.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.48-7.40 (m, 5 H, Ar-H), 2.43 (s, 3 H, OCH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹³⁷

III.16. Synthese der Substrate und der Referenzsubstanzen für die Halogenierungsassays

III.16.1. (4-Hydroxyphenyl)-2-oxo-essigsäuremethylester (159)



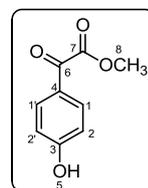
100 mg (0.46 mmol, 1.00 eq) D-HPG-OMe (**17**) wurden in einer frisch hergestellten wässrigen Lösung aus 423 mg (4.59 mmol, 10.00 eq) Glyoxylsäure und 116 mg (0,46 mmol, 1.01 eq) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 50 mL eines Puffers mit 2.5 M Pyridin und 0.5 M Essigsäure bei RT gelöst. Die Mischung wurde 20 h bei RT gerührt. Es wurden 5 gleiche Ansätze durchgeführt, die zusammen aufgearbeitet wurden. Dabei wurden die vereinigten Reaktionslösungen drei Mal mit EtOAc extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit 0.5 M HCl so oft gewaschen, bis die wässrige Phase nur noch blass blau war (ca. 5 x), und ein Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nachdem über MgSO_4 getrocknet und filtriert wurde, wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt **159** als grüne, klare Flüssigkeit erhalten (37 %, 150 mg, 0.83 mmol)

Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$

Molmasse: 180.16 g/mol.

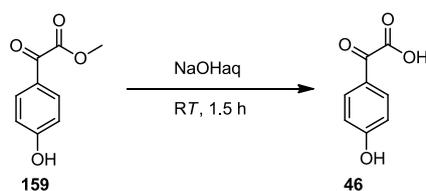
EI (70 eV) m/z (%): 180.0 (18) $[\text{M}]^+$, 121.0 (100), 93.0 (18), 59.1 (6).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6): δ = 9.67 (br, 1 H, H-5), 7.89 (d, J = 8.7 Hz, 2 H, H-1, H-1'), 7.01 (d, J = 8.7 Hz, 2 H, H-2, H-2'), 3.94 (s, 3 H, H-8).



Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹³³

III.16.2. 2-(4-Hydroxyphenyl)-2-oxo-essigsäure (46)



Der Ketoester **159** (150 mg, 0.83 mmol, 1.0 eq) wurde in 5.64 mL (14.11 mmol, 17.0 eq) 2.5 M NaOH unter Eisbadkühlung gelöst und 1.5 h bei RT gerührt. Nach 1 h wurde der Ester vollständig in die freie Säure umgesetzt (HPLC-Kontrolle). Die wässrige Reaktionslösung wurde mit 10 % iger KHSO_4 bis zu einem pH-Wert von 1 angesäuert und drei Mal mit EtOAc extrahiert. Anschließend wurde mit gesättigter NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nachdem das Produkt **46** von dem Lösungsmittel unter vermindertem Druck befreit wurde, blieb ein gelbes Pulver in einer Ausbeute von 72 % (98 mg, 0.59 mmol) zurück.

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$

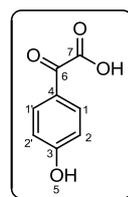
Molmasse: 166.13 g/mol.

ESI-MS (negativ): $m/z = 165.0$ [M-H].

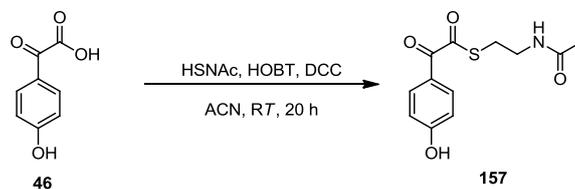
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 10.81$ (br, 1 H, H-5), 7.80 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H, H-2, H-2').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 187.0$ (1 C, C-7), 166.7 (1 C, C-6), 163.9 (1 C, C-3), 132.3 (2 C, C-1, C-1'), 123.3 (1 C, C-4), 116.0 (2 C, C-2, C-2').

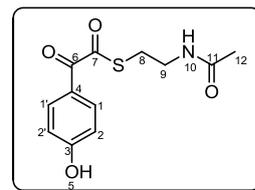
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.¹³³



III.16.3. 2-(4-Hydroxyphenyl)-2-oxo-ethylthiolsäure-2-acetamido-ethylester (157)



Unter Argon-Atmosphäre wurde zu der Ketosäure **46** (49 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) gelöst in trockenem 8.8 mL (30 mL/mmol) ACN, HOBT (51 mg, 0.33 mmol, 1.1 eq), DCC (68 mg, 0.33 mmol, 1.1 eq) und HSNAc (94 μ L, 105 mg, 0.89 mmol, 3.0 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei RT gerührt und anschließend zentrifugiert (3234 rpm, 10 min). Das Lösungsmittel des Überstands wurde unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit dem Laufmittel DCM/MeOH - 95:5 gereinigt. Der Thioester **157** wurde als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 47 % (38 mg, 0.14 mmol) erhalten.



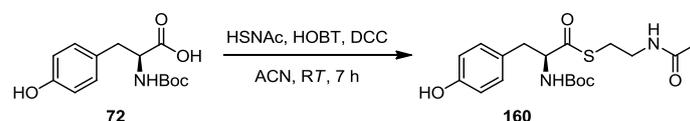
Summenformel: $C_{12}H_{13}NO_4S$.

Molmasse: 267.30 g/mol.

HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 268.0637$ $[M + H]^+$ ($m/z = 268.0644$ $[M + H]^+$ berechnet für $C_{12}H_{14}NO_4S$), 290.0456 $[M + Na]^+$ ($m/z = 290.0463$ $[M + Na]^+$ berechnet für $C_{12}H_{13}NNaO_4S$).

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.92$ (br, 1 H, H-5), 8.13 (t, $J = 5.4$ Hz, 1 H, H-10), 7.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.93 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 3.33 (dd, $J = 12.5, 6.3$ Hz, 2 H, H-9), 3.10 (t, $J = 6.7$ Hz, 1 H, H-8), 1.80 (s, 3 H, H-12).

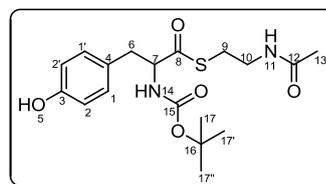
III.16.4. 2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-hydroxyphenyl)propylthiolsäure-2-acetamido-ethylester (**160**)



Unter Argon-Atmosphäre wurde zu einer Lösung aus 200 mg (0.71 mmol, 1.0 eq) Boc-L-Tyr (**72**) in 20 mL (30 mL/mmol) ACN 122 mg (0.8 mmol, 1.1 eq) HOBT, 165 mg (0.8 mmol, 1.1 eq) DCC und 755 μL (846 mg, 7.1 mmol, 10 eq) HSNAC zugegeben und bei RT 7 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend zentrifugiert (3300 rpm, 10 min) und das Lösungsmittel des Überstands unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe der MPLC gereinigt. Hierbei wurden A = H_2O + 0.05% TFA und B = ACN + 0.05 % TFA als Laufmittel verwendet. Folgender Gradient wurde verwendet: 0 - 1.8 min 5% B, 1.8 - 22.0 min 5 - 95% B und 22.0 - 24.6 min 95 % B über eine Reveleris C18 40 g RP-Säule mit einem konstanten Fluss von 40 mL/min. Der Thioester **160** wurde nach Evaporation des ACN bei 31 °C Wasserbad-Temperatur und Entfernen des Wassers durch Lyophilisation als weißes Pulver in einer Ausbeute von 67 % (182 mg, 0.48 mmol) erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$.

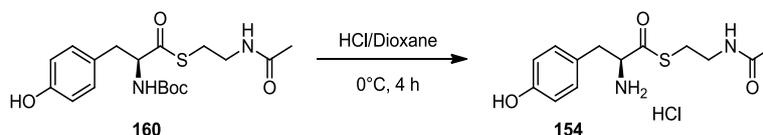
Molmasse: 382.47 g/mol.



HR-ESI-MS (positiv): $m/z = 383.1633$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($m/z = 383.1641$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$).

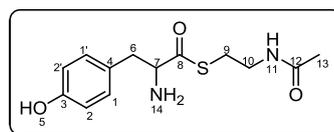
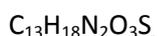
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9.20$ (br, 1 H, H-5), 8.02 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H, H-11), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, H-14), 7.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 4.13 (ddd, $J = 10.6, 8.1, 4.4$ Hz, 1H, H-7), 3.13 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-10), 2.91 (dd, $J = 14.1, 4.4$ Hz, 1 H, H-6), 2.86 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H, H-9), 2.67 (dd, $J = 13.9, 10.6$ Hz, 1 H, H-6), 1.79 (s, 3 H, H-13), 1.33 (s, 9 H, H-17, H-17', H-17'').

III.16.5. 2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propylthiolsäure-2-acetamidoethylester (154)



65 mg (0.17 mmol, 1.0 eq) des *N*-geschützten SNAC-L-Tyrosins **160** wurde bei 0 °C mit 0.38 mL (1.53 mmol, 9.0 eq) 4 M HCl in Dioxan versetzt und bei RT gerührt. Die Reaktion wurde nach 0.5 h mittels HPLC kontrolliert. Dies zeigte, dass sich nur ein minimaler Anteil geschützten Amids in die freie Amino-Form umgesetzt hatte. Aus diesem Grund wurden nach 50 min weitere 0.38 mL HCl in Dioxan unter Eisbadkühlung zugegeben. Die HPLC-Reaktionskontrolle nach 3 h Reaktionszeit bei RT erwies eine vollständige Umsetzung in die freie Amino-Form. Nach 4 h wurden überschüssiges HCl und Dioxan unter vermindertem Druck entfernt und es wurde mit EtOAc und ACN jeweils drei Mal gewaschen. Das Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum liefert das Produkt **154** als weißes Pulver in quantitativer Ausbeute (54 mg, 0.17 mmol).

Summenformel:



Molmasse:

282.36 g/mol.

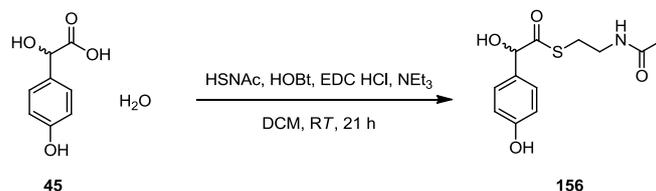
HR-ESI-MS (positiv):

$m/z = 283.1110$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($m/z = 283.1116$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$), 305.0930 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($m/z = 305.0936$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S}$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.76$ (br, 3 H, H-5, H-14), 8.20 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H, H-11), 7.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 4.30 (q, $J = 6.1$ Hz, 1 H, H-7), 3.13 (m, 2 H, H-10), 3.08 (dd, $J = 14.1, 5.6$ Hz, 1 H, H-6), 2.99 (dd, $J = 14.25, 7.7$ Hz, 2 H, H-6), 2.95 (t, $J = 6.4$ Hz, 2 H, H-9), 1.79 (s, 3 H, H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 196.1$ (1 C, C-8), 169.5 (1 C, C-12), 156.8 (1 C, C-3), 130.6 (2 C, C-1, C-1'), 124.1 (1 C, C-4), 115.5 (2 C, C-2, C-2'), 59.8 (1 C, C-7), 37.8 (1 C, C-9), 36.1 (1 C, C-10), 28.3 (1 C, C-6), 22.6 (1 C, C-13).

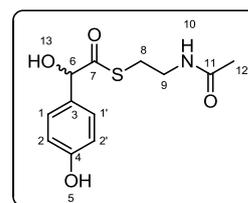
III.16.6. 2-(4-Hydroxyphenyl)-2-hydroxy-ethylthiolsäure-2-acetamido-ethylester (156)



Zu einer Lösung aus Triethylamin (75.0 μ L, 0.54 mmol, 2.00 eq) in 2 mL DCM wurde unter Argon-Atmosphäre DL-HMA \cdot H₂O (DL-45) (50.0 mg, 0.27 mmol, 1.00 eq), EDC \cdot HCl (51.6 mg, 0.27 mmol, 1.00 eq.), HOBT (36.3 mg, 0.27 mmol, 1.00 eq) und HSNac (28.6 μ L, 0.27 mmol, 1.00 eq) zugegeben und für 21 h bei RT gerührt. Nachdem DCM unter vermindertem Druck mit einer Wasserbad-Temperatur von 31 °C entfernt wurde, wurde das Rohprodukt mittels MPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-1 min 95% A, 1-13.9 min 95% B; Säule: Reveleris[®] C18, 12 g; Flussrate: 30 mL/min) gereinigt. Hierzu wurde der Rückstand in ACN/H₂O (4:6, HPLC-grade) gelöst. Das reine Produkt **156** wurde als weißes Pulver in einer Ausbeute von 42 % (30.3 mg, 0.11 mmol) erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₅NO₄S.

Molmasse: 269.32 g/mol.

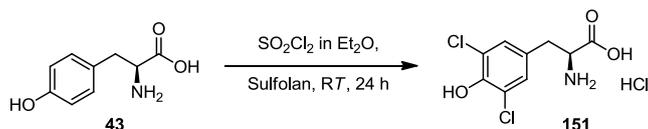


ESI-MS (positiv): $m/z = 292.0$ [M + Na]⁺, 556.3 [2M + H₂O + H]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 8.06 - 7.98$ (m, 1 H, H-10), 7.19 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H, H-1, H-1'), 6.73 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-2, H-2'), 5.03 (s, 1 H, H-6), 3.12 (q, $J = 6.6$ Hz, 2 H, H-9), 2.78 (dt, $J = 12.9, 6.9$ Hz, 2 H, H-8), 1.77 (s, 3 H, H-12).

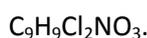
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 203.5$ (1 C, C-7), 169.3 (1 C, C-11), 157.2 (1 C, C-4), 129.9 (1 C, C-3), 128.0 (2 C, C-1, C-1'), 115.0 (2 C, C-2, C-2'), 78.2 (1 C, C-6), 38.0 (1 C, C-9), 37.3 (1 C, C-8), 22.5 (1 C, C-12).

III.16.7. 3,5-Dichlor-L-tyrosin⁹² (**151**)



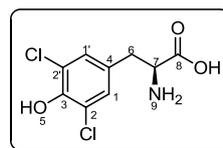
Unter Argon-Atmosphäre wurde L-Tyr (**43**) (100 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq) in 2 mL (3.7 mL/mmol L-Tyr) Sulfolan suspendiert und bei RT gerührt. Über einen Tropftrichter wurde Sulfurylchlorid (200 µL, 334 mg, 2.48 mmol, 4.5 eq) gelöst in 2 mL (0.8 mL/mmol SO₂Cl₂) trockenem Et₂O zugegeben. Die nach der SO₂Cl₂-Zugabe entstandene Lösung wurde 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Produkt mit wasserfreiem DCM ausgefällt. Es wurde so viel DCM zugegeben, bis kein weißer Niederschlag mehr ausfiel. Das weiße 3,5-Dichlor-L-tyrosin Hydrochloridsalz (**151**) wurde filtriert, mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Dies erbrachte eine Ausbeute von 76 % (120 mg, 0.42 mmol).

Summenformel:



Molmasse:

250.08 g/mol.



ESI-MS (negativ):

$m/z = 248.0$ [M-H]⁻.

HR-ESI-MS (negativ):

$m/z = 247.9886$ [M-H]⁻ ($m/z = 247.9887$ [M - H]⁻ berechnet für C₉H₈Cl₂NO₃).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O):

$\delta = 7.29$ (s, 2 H, H-1, H-1'), 4.18 (dd, $J = 7.6, 5.6$ Hz, 1 H, H-7), 3.24 (dd, $J = 14.8, 5.6$ Hz, 1 H, H-6), 3.11 (dd, $J = 14.8, 7.7$ Hz, 1 H, H-6).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.⁹²

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3670–3695.
- [2] Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Pharm. Biol.* **2001**, *39*, 8–17.
- [3] Dev, S. *Environmental Health Perspectives* **1999**, *107*, 783-789.
- [4] Cragg, G. M.; Paul, G. G.; Newman, D. J. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 703-723.
- [5] Blakemore, P. R.; White, J. D. *Chem. Comm.* **2002**, 1159-1168.
- [6] Kuhnert, N. *Pharm. Zeit* **2000**, *29*, 32-39.
- [7] Chain, E.; Florey, H. W. *Endeavour* **1944**, *3*, 3-14.
- [8] Faulkner, D. J. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1421-1443.
- [9] Newmann, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215–234.
- [10] Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Doubek, D. L.; Herald, D. L. *J. Am. Chem. SOC.* **1982**, *104*, 6846-6848.
- [11] Bringmann, G.; Lang, G.; Gulder, T. A. M.; Tsuruta, H.; Mühlbacher, J.; Maksimenka, K.; Steffens, S.; Schaumann, K.; Stöhr, R.; Wiese, J.; Imhoff, J. F.; Perovic´-Ottstadt, S.; Boreikod; O.; Müller, W. E. G. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7252-7265.
- [12] Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52-60.
- [13] Newmann, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
- [14] Newmann, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
- [15] Newmann, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.
- [16] Cragg, G. M.; Paul, G. G.; Newman, D. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012–3043.
- [17] Butler, M. S. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141-2153.
- [18] Bérdy, J. *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 385–395.
- [19] Wang, P.; Gao, X.; Tang, Y. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 362–369.

- [20] Aldemir, H.; Richarz, R.; Gulder, T. A. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8286–8293.
- [21] Hubbard, B. K.; Walsh, C. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 730-765.
- [22] a) Schimanaka, J.; Gebhardt, K.; Höltzel, A.; Schmid, D.; Süssmuth, R.; Müller, J.; Pukall, R.; Fiedler, H.-P. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 565–570. b) Höltzel, A.; Schmid, D.; Nicholson, G. J.; Stevanovic, S.; Schimanaka, J.; Gebhardt, K.; Fiedler, H.-P.; Jung, G. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 571-577.
- [23] Marahiel, M. A. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **1992**, *307*, 40-43.
- [24] Walsh, C. T.; Chen, H.; Keating, T. A.; Hubbard, B. K.; Losey, H. C.; Luo, L.; Marshall, C. G.; Miller, D. A.; Patel H. M. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 525–534.
- [25] Walsh, C. T.; Fisher, S. L.; Park, I.-S.; Prahalad, M.; Wu, Z. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 21-28.
- [26] Paetzel, M.; Goodall, J. J.; Kania, M.; Dalbey, R. E.; Page, M. G. P. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30781-30790.
- [27] Luo, C.; Roussel, P.; Dreier, J.; Page, M. G. P.; Paetzel M. *Biochemistry* **2009**, *48*, 8976–8984.
- [28] Roberts, T. C.; Smith, P. A.; Cirz, R. T.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15830-15838.
- [29] van Wageningen, A. M. A.; Kirkpatrick, P. N.; Williams, D. H.; Harris, B. R.; Kershaw, J. K.; Lennard, N. J.; Jones, M.; Jones, S. J. M.; Solenberg, P. J. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 155.
- [30] Pelzer, S.; Süssmuth, R. D.; Heckmann, D.; Recktenwald, J.; Huber, P.; Jung, G.; Wohlleben, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1565.
- [31] Shwaky, R. M.; Puk, O.; Wietzorrek, A.; Pelzer, S.; Takano, E.; Wohlleben, W.; Stegmann, E. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *13*, 76.
- [32] Pootoolal, J.; Thomas, M. G.; Marshall, C. G.; Neu, J. M.; Hubbard, B. K.; Walsh, C. T.; Wright, G. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8962.
- [33] Sosio, M.; Stinchi, S.; Beltrametti, F.; Lazzarini, A.; Donadio, S. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 541.
- [34] Sosio, M.; Kloosterman, H.; Bianchi, A.; De Vreugd, P.; Dijkhuizen, L.; Donadio, S. *Microbiology* **2004**, *150*, 95.

- [35] Li, T.-L.; Huang, F.; Haydock, S. F.; Mironenko, T.; Leadley, P. F.; Spencer, J. B. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 107.
- [36] Chiu, H.-T.; Hubbard, B. K.; Shah, A. N.; Eide, J.; Fredenburg, R. A.; Walsh, C. T.; Khosla, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8548-8553.
- [37] Hadatsch, B.; Butz, D.; Schmiederer, T.; Steudle, J.; Wohlleben, W.; Süßmuth, R. D.; Stegmann, E. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1078.
- [38] Wohlleben, W.; Stegmann, E.; Süßmuth, R. D. *Methods Enzymol.* **2009**, *458*, 459.
- [39] Pelzer, S.; Reichert, W.; Huppert, M.; Heckmann, D.; Wohlleben, W. *J. Biotechnol.* **1997**, *56*, 115.
- [40] Süßmuth, R. D.; Pelzer, S.; Nicholson, G.; Walk, T.; Wohlleben, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1976.
- [41] Bischoff, D.; Pelzer, S.; Hölzel, A.; Nicholson, G. J.; Stockert, S.; Wohlleben, W.; Jung, G.; Süßmuth, R. D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 1693.
- [42] Bischoff, D.; Pelzer, S.; Bister, B.; J. Nicholson, G.; Stockert, S.; Schirle, M.; Wohlleben, W.; Jung, G.; Süßmuth, R. D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 40688.
- [43] Stegmann, E.; Pelzer, S.; Bischoff, D.; Puk, O.; Stockert, S.; Butz, D.; Zerbe, K.; Robinson, J. A.; Süßmuth, R. D.; Wohlleben, W. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 640.
- [44] Li, D. B.; Woithe, K.; Geib, N.; Abou-Hadeed, K.; Zerbe, K.; Robinson, J. A. *Methods Enzymol.* **2009**, *458*, 487.
- [45] Haslinger, K.; Peschke, M.; Brieke, C.; Maximowitsch, E.; Cryle, M. J. *Nature* **2015**, *521*, 105-109.
- [46] Kaneko, I.; Fearon, D. T.; Austen, K. F. *J. Immunol.* **1980**, *124*, 1194-1198.
- [47] Jayasuriya, H.; Salituro, G. M.; Smith, S. K.; Heck, J. V.; Gould, S. J.; Singh, S. B.; Homnick, C. F.; Holloway, M. K.; Pitzengerger, S. M.; Patane, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2247-2248.
- [48] Kaneko, I.; Kamoshida, K.; Takahashi, S. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 236-241.
- [49] Hegde, V. R.; Puar, M. S.; Dai, P.; Patel, M.; Gullo, V. P.; Chan, T.-M.; Silver, J.; Pramanik, B. N.; Jenh, C.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 573-575.

- [50] Seto, H.; Fujioka, T.; Furihata, K.; Kaneko, I.; Takahashi, S. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4987-4990.
- [51] Momotal, K.; Kaneko, I.; Kimural, S.; Mitamural, K.; Shimada, K. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **1991**, *179*, 243-250.
- [52] Matsuzaki, K.; Ikeda, H.; Ogino, T.; Matsumoto, A.; WoodruffH. B.; Tanaka, H.; Omura, S. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1173-1174.
- [53] Singh, S. B.; Jayasuriya, H.; Salituro, G. M.; Zink, D. L.; Shafiee, A.; Heimbuch, B.; Silverman, K. C.; Lingham, R. B.; Genilloud, O.; Teran, A.; Vilella, D.; Felock, P.; Hazuda, D. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 874-882.
- [54] Preobrazhenskaya, M. N.; Olsufyeva, E. N. *Antivir. Res.* **2006**, *71*, 227-236.
- [55] Kim, E.-C.; Yun, B.-S.; Ryoo, I.-J.; Min, J.-K.; Won, M. H.; Lee, K.-S.; Kim, Y.-M.; Yoo, I.-D.; Kwon, Y.-G. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **2004**, *313*, 193-204.
- [56] Seo, S. Y.; Yun, B.-S.; Ryoo, I.-J.; Choi, J.-S.; Joo, C.-K.; Chang, S.-Y.; Chung, J.-M.; Oh, S.; Gwag, B. J.; Doo, I. D. *J. Pharmac. Experim. Therap.* **2001**, *299*, 377-384.
- [57] Tiachikawa, T.; Hasumi, K.; Endol, A. *Thromb. Res.* **1997**, *87*, 571-576.
- [58] Kwon, Y.-J.; Kim, H.-J.; Kim, W.-G. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 715-721.
- [59] Gurjar, K.; Tripathy, M. K. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2163-2166.
- [60] Elder, A. M.; Rich, D. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1443-1446.
- [61] Carbonnelle, A.-C.; Zamora, G. E.; Beugelmans, R.; Roussi, G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4467-4470.
- [62] Carbonnelle, A.-C.; Zamora, G. E.; Beugelmans, R.; Roussi, G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4471-4472.
- [63] Smith, A. B.; Chruma, J. J.; Han, Q.; Barbosa, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1697-1702.
- [64] Yamada, Y.; Akiba, A.; Arima, S.; Okada, C.; Yoshida, K.; Itou, F.; Kai, T.; Satou, T.; Takeda, K.; Harigaya, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 1277-1290.
- [65] Yamada, Y.; Arima, S.; Okada, C.; Akiba, A.; Kai, T.; Harigaya, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 788-794.

- [66] Jia, Y.; Bois-Choussy, M.; Zhu, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2401-2404.
- [67] Shinohara, T.; Deng, H.; Snapper, M. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7334–7336.
- [68] Deng, H.; Jung, J.-K.; Liu, T.; Kuntz, K. W.; Snapper, M. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9032-9034.
- [69] Garfinkle, J.; Kimball, F. S.; Trzupek, J. D.; Takizawa, S.; Shimamura, H.; Tomishima, M.; Boger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16036–16038.
- [70] Shimamura, H.; Breazzano, S. P.; Garfinkle, J.; Kimball, F. S.; Trzupek, J. D.; Boger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *132*, 7776–7783.
- [71] Wang, Z.; Bois-Choussy, M.; Jia, Y.; Zhu, J. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2062–2066.
- [72] Jia, Y.; Bois-Choussy, M.; Zhu, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4167–4172.
- [73] Sewald, N.; Jakubke, H.-D. *Peptides: Chemistry and Biology* **2009**, 2. Ausgabe, 75-96, WILEY-VCH-Verlag, Weinheim, ISBN: 978-3-527-31867-4.
- [74] Mootz, H. D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 490-504.
- [75] Finking, R.; Marahiel, M. A. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453–488.
- [76] Hur, G. H.; Vickery, C. R.; Burkart, M. D. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1074-1098.
- [77] Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468-3496.
- [78] Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A. *Nat. Prod. Rep.*, **2003**, *20*, 275–287.
- [79] Walsh, C. T.; Gehring, A. M.; Weinreb, P. H.; Quadri, L. E.; Flugel, R. S. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 309-315.
- [80] Sieber, S. A.; Marahiel, M. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715-738.
- [81] van Pée, K.-H. *Methods Enzymol.* **2012**, *516*, 237-257.
- [82] Hammond, S. J.; Williamson, M. P.; Williams, D. H.; Boeck, H. D.; Marconib, G. G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 344-346.
- [83] Hubbard, B. K.; Thomas, M. G.; Walsh, C. T. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 931-942.

- [84] Woithe, K.; Geib, N.; Zerbe, K.; Dong, L. B.; Heck, M.; Fournier-Rousset, S.; Meyer, O.; Vitali, F.; Matoba, N.; Abou-Hadeed, K.; Robinson, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6887-6895.
- [85] Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [86] Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239-254.
- [87] Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, I.; Papaioannou, D.; Sotiriou, P. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1079-1081.
- [88] Harre, M.; Nickisch, K.; Tilstam, U. *React. Funct. Polym.* **1999**, *41*, 111-114.
- [89] Al Toma, R. S.; Brieke, C.; Cryle, M. J.; Süßmuth, R. D. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 1207-1235.
- [90] Li, D. B.; Robinson, J. A. *Org. Biomol. Chem* **2005**, *3*, 1233-1239.
- [91] Becker, D.; Kazmaier, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2591-2602.
- [92] Allevi, P.; Olivero, P.; Anastasia, M. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2004**, *47*, 935-945.
- [93] Freidinger, R. M.; Hinkle, J. S.; Perlow, D. S.; Arison, B. H. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77-81.
- [94] Khalil, E. M.; Subasinghe, N. L.; Johnson, R. L. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3441-3444.
- [95] Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301-2302.
- [96] Biron, E.; Chatterjee, J.; Kessler, H. *J. Peptide Sci.* **2006**, *12*, 213-219.
- [97] Marcucci, E.; Tulla-Puche, J.; Alberico, F. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 612-615.
- [98] Stolze, S. C.; Meltzer, M.; Ehrmann, M.; Kaiser, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1616-1625.
- [99] Brieke, C.; Cryle, M. J. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2454-2457.
- [100] Liu, W.-T.; D. Kersten, R.; Yang, Y.-L.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18010-18013.
- [101] Brieke, C.; Kratzig, V.; Haslinger, K.; Winkler, A.; Cryle, M. J. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2012-2021.
- [102] Strieker, M.; Tanović, A.; Marahiel, M. A. *Cur. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 234-240.
- [103] Bachmann, B. O.; Ravel, J. *Method. Enzymol.* **2009**, *458*, 181-217.

- [104] Fielding, E. N.; Widboom, P. F.; D. Bruner, S.; *Biochemistry* **2007**, *46*, 13994-14000.
- [105] van Pée, K.-H.; Patallo, E. P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 631–641.
- [106] Fujimori, D. G.; Walsh, C. T. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 553–560.
- [107] Hohaus, K.; Altmann, A.; Burd, W.; Fischer, I.; E. Hammer, P.; Hill, D. S.; Ligon, J. M.; van Pée, K.-H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2012-2013.
- [108] Keller, S.; Wage, T.; Hohaus, K.; Hölzer, M.; Eichhorn, E.; van Pée, K.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2300-2302.
- [109] Yeh, E.; Garneau, S.; Walsh, C. T. *PNAS* **2005**, *102*, 3960-3965.
- [110] van der Ploeg, J. R.; Iwanicka-Nowicka, R.; Bykowski, T.; Hryniewicz, M. M.; Leisinger, T. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29358-29365.
- [111] von der Linden, Anna *Biochemical Characterization of Enzymes for Selective Functionalization of Amino Acids* **2013**, Bachelorarbeit, Kekulé-Institut für Organische und Biochemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [112] Schmartz, P. C.; Zerbe, K.; Abou-Hadeed, K.; Robinson, J. A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5574-5577.
- [113] Blasiak, L. C.; Drennan, C. L. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 147–155.
- [114] Harper, D. B.; O’Hagan, D. *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 123–133.
- [115] Jason, K. K.; O’Hagan, D. *Methods Enzymol.* **2012**, *516*, 219–235.
- [116] Dong, C.; Huang, F.; Deng, H.; Schaffrath, C.; Spencer, J. B.; O’Hagan, D.; Naismith, J. H. *Nature* **2004**, *427*, 561–565.
- [117] Jaivel, N.; Uvarani, C.; Rajesh, R.; Velmurugan, D.; Marimuthu, P. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2–8.
- [118] Aldemir, H.; Kohlhepp, S. V.; Gulder, T.; Gulder, T. A. M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2331–82334.
- [119] Ayoup, M. S.; Cordes, D. B.; Slawin, A. M. Z.; O’Hagan, D. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1249–1251.
- [120] Marteau, C.; Nardello-Rataj, V.; Favier, D.; Aubry, J.-M. *Flavour Fragr. J.* **2013**, *28*, 30–38.
- [121] Beer, S.; Teasdale, I; Brueggemann, O *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 4257–4264.

- [122] J. M. Jez, J-L. Ferrer, M. E. Browman, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 890.
- [123] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557.
- [124] Jaenicke, L. *Biospektrum* **2007**, *13*, 456-458.
- [125] Gallo, R. D. C.; Gebara, K. S.; Muzzi, R. M.; Raminelli, C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 770-774.
- [126] Airiau, E.; Girard, N.; Mann, A.; Salvadori, J.; Taddei, M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5314-5317.
- [127] Jana, P.; Maity, S.; Maity, S. K.; Haldar, D. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2092–2094.
- [128] Sasaki, T.; Nose, H.; Hosoya, A.; Yoshida, S.; Kawaguchi, M.; Watanabe, T.; Usui, T.; Ohtsuka, Y.; Shomura, T.; Takano, S.; Tatsuta, K. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 38-44.
- [129] White, K. N.; Konopelski, J. P. *Org. Lett.*, 2005, *7*, 4111–4112.
- [130] Gaudelli, N. M.; Townsend, C. A. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6412–6426.
- [131] Dufour, J.; Neuville, L.; Zhu J. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10523-10534.
- [132] Sun, H.; Zhang, J.; Liu, Q.; Yu, L.; Zhao, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6068 –6072.
- [133] Chen, Y. T.; Seto; C. T. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3946-3952.
- [134] Manchineella, S.; Prathyusha, V.; Priyakumar, U. D.; Govindaraju, T. *Chemistry* **2013**, *19*, 16615-16624.
- [135] Naskar, J.; Drew, M. G.; Deb, I.; Das, S.; Banerjee, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2625-2628.
- [136] Ibrahim, T. S.; Tala, S. R.; El-Feky, S. A.; Abdel-Samii, Z. K.; Katritzky, A. R. *Synlett* **2011**, *14*, 2013-2016.
- [137] Kumara, N. U.; Reddya, B. S.; Reddyb, V. P.; Bandichho R. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 910-912.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A-Domäne:	Adenylierungs-Domäne
ACN:	Acetonitril
Alloc:	Allyloxycarbonyl
Alloc-OSu:	Alloc-Succinimidester
aq:	wässrig (engl. aqueous)
ATP:	Adenosintriphosphat
ADP:	Adenosindiphosphat
BEPS:	Biaryl- und Biarylether-Kupplungen enthaltende Peptide
Boc:	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O:	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
C-Domäne:	Kondensations-Domäne
CoA:	Coenzym A
COMU:	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphat
CYP450:	Cytochrom-P450
DBU:	1,8-DIAZABICYCLO[5.4.0]UNDEC-7-EN
DCC:	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM:	Dichlormethan
DIC:	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA:	Diisopropylethylamin
DMF:	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
EDC HCl:	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
eq:	Äquivalente
E-Domäne:	Epimerisierungs-Domäne
Fa.:	Firma
FAD:	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fmoc:	9-Flourenylmethoxycarbonyl
HATU:	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU:	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat
HIV:	Humanes Immundefizienz Virus
HMA:	Hydroxymandelsäure (engl. Hydroxymandelic acid)

HPPA :	3-(4-Hydroxyphenyl)-2-oxopropansäure (engl. -propionic acid)
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HOAT:	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBT:	1-Hydroxybenzotriazol
HPG:	Hydroxyphenylglycin
KPP:	Kaliumphosphatpuffer
LPPS:	Flüssigphasenpeptidsynthese (engl. Liquid phase peptide synthesis)
M-Domäne:	<i>N</i> -Methylierungs-Domäne
MS:	Massenspektrometrie
m/z:	Masse/Ladung
NAD(P)H:	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
NBS:	Nitrobenzolsulfonyl
NMM:	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP:	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR:	Kernresonanzspektroskopie (engl.
NRPS:	Nicht-ribosomale Peptidsynthese
PCP:	Peptidyl-Carrier-Protein
Ppant:	Phosphopantetheinyl
PPTase:	Phosphopantetheinyl-Transferase
PPTS:	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
PyBrOP:	Bromo-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
PyBop:	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphate
RNA:	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
RT:	Raumtemperatur
R _f :	Retentionsfaktor
SNAc:	<i>N</i> -Acetylcysteamin
S _N Ar:	nukleophile Substitution am Aromaten
S _N i:	innere nukleophile Substitution
SPPS:	Festphasenpeptidsynthese (engl. Solid phase peptide synthesis)
T-Domäne:	Thiolierungs-Domäne
TE:	Thioesterase
TFA:	Trifluoressigsäure (engl. Trifluoroacetic acid)
THF:	Tetrahydrofuran
TMS-Br:	Trimethylsilylbromid
t _R :	Retentionszeit

